T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Viscum album L. EKSTRAKTININ İNSAN AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA (A549) PROLİFERASYON VE APOPİTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

Fadime OVALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Viscum album L. EKSTRAKTININ İNSAN AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA (A549) PROLİFERASYON VE APOPİTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

Fadime OVALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202075 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ONAY SAYFASI

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV yürütücülüğünde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisansa başladığımdan bugüne bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana her türlü desteği veren, beni yönlendiren ve hayatımda yeri çok ayrı olan çok kıymetli sayın danışman hocam Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ders dönemim ve tez sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen, bana yol gösteren sayın Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e, ders dönemim boyunca büyük katkıları olan Prof. Dr. Ali ÜNLÜ, Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU ve Doç. Dr. Esma MENEVŞE'ye teşekkür ederim.

Hangi konuda olursa olsun yardımına başvurabileceğimi bildiğim, desteğini yardımını hiç esirgemeyen çok değerli hocam sayın Hakan VATANSEV'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan İlkay SAK, Fatma AKAT, Hilal TESTİCİ, Eissa ALMAGHREBİ ve Büşra TOK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan, maddi manevi desteğini hiç esirgemeyen, bu yolda en büyük motivasyon kaynağım olan annem Meliha ERÖZTÜRK ve abim Haceli OVALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR v
TABLOLAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ ix
ÖZET i
SUMMARY ii
1. GİRİŞ 1
1.1. Akciğer Kanseri 2
1.1.1. Akciğer Kanserinde Risk Faktörleri 4
1.1.2. Tümör Supresör Genler 7
1.1.3. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması 9
1.1.4. Tedavi 12
1.2. A549 Hücre Hattı 13
1.3. HEK-293 Hücre Hattı 14
1.4. *Viscum album* L. 15
1.4.1. *Viscum album* L.'nin Etki Mekanizması 19
1.4.2. *Viscum album* L. Bitkisinin Kimyasal Bileşimi 20
1.4.3. Lektinler 22
1.4.4. Viskotoksinler 23
1.4.5. Triterpenler 23
2. GEREÇ VE YÖNTEM 24
2.1. Gereçler 24
2.1.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar 24
2.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Gereçleri 24
2.2. Yöntem 25
2.2.1. *Viscum album* L. Bitkisinin Ekstraksiyonu 25
2.2.2. Besiyeri Hazırlama 26

2.2.3. Sıvı Azot Tankından Hücre Çıkarma.....26
2.2.4. Hücre Dondurma 26
2.2.5. Hücre Pasajlama 27
2.2.6. *Viscum album* L. Dozlarının Ayarlanması 27
2.2.7. A549 Hücrelerine *Viscum album* L. Ekstraktı Dozlarının Uygulanması.....27
2.2.8. MTT Yöntemi İle IC_{50} Değerinin Tespiti 28
2.2.9. Annexin V Yöntemi İle Apopitoz Analizi 29
3. BULGULAR 33
3.1. *Viscum album* L. Ekstraktı Uygulanmış A549 ve HEK-293 Hücrelerinin MTT Yöntemi İle Belirlenmiş IC_{50} Değerleri 33
3.2. Muse/Flow Sitometri Cihazında Annexin V Yöntemi İle Apopitoz Analizi Sonuçları.....36
4. TARTIŞMA 39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....45
6. KAYNAKLAR.....47
7. EKLER.....51
8. ÖZGEÇMİŞ 52

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHH: Aril hidrokarbon hidroksilaz

ATP: Adenozin Trifosfat

ATII: Alveolar Tip II

CO_2: Karbondioksit

Cl: Klor

DMEM: Dulbecco′s Modified Eagle′s – Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

FBS: Fetal sığır serumu

FITC: Floresan İzotiyosiyanat

GST-M1: Glutatyon S-transferaz Mu 1

IL-1: İnterlökin-1

IL-6: İnterlökin-6

IL-12: İnterlökin-12

JNK: c-JUN-Terminal Kinaz

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

K: Potasyum

kDa: Kilodalton

LCC: Büyük Hücreli Karsinomlar

LOH: Heterozigot Kaybı

mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit

miRNA: Mikro Ribo Nükleik Asit

ml: Mili Litre

µg: Mikro Gram

ML: Lektinler

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

nAChR: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü

NAT: N asetil tranferaz

Na: Sodyum

ng: Nanogram

NK: Doğal Öldürücü

PS: Fosfotidil Serin

PAH: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

PBS: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su

RB: Retinoblastoma

RNA: Ribo Nükleik Asit

Rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

Sqcc: Squamöz Hücreli Karsinoma

TKI: Tirozin Kinaz İnhibitör

TT: Triterpen

TNF-α: Tümör Nekroz Faktör

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

VA: *Viscum album*

VAE: *Viscum album* Ekstraktı

VT: Viskotoksinler

%: Yüzde

ºC: Santigrat Derece

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. WHO 2015 akciğer kanseri sınıflandırılması

Tablo 1.2. *Viscum album* L. bitkisinin kimyasal içeriği

Tablo 3.1. *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 72. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

Tablo 3.2. *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 48. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tümör metabolik fenotipinin belirleyicileri

Şekil 1.2. Kanserin ayırt edici 10 özelliği

Şekil 1.3. Akciğer kanserinde tümör baskılayıcı yollarındaki değişiklikler

Şekil 1.4. Kanser Belirteçlerinin Terapötik Hedeflemesi

Şekil 1.5. A549 hücrelerinin düşük ve yüksek yoğunluklu mikroskop görüntüleri (ATCC).

Şekil 1.6. HEK-293 hücrelerinin düşük ve yüksek yoğunluklu mikroskop görüntüleri (ATCC).

Şekil 1.7. Erik ve badem ağacı üzerinde *Viscum album* L.bitkisi

Şekil 1.8. *Viscum album* L. çiçeği

Şekil 1.9. *Viscum album* olgunlaşmamış ve olgunlaşmış meyvesi

Şekil 1.10. *Viscum album* L'nin kuşlar aracılığıyla yayılması

Şekil 1.11. *Viscum album* L'nin haustorium ile yeni konakçıya tutunması

Şekil 2.1. MTT'nin formazana enzimatik indirgenmesi

Şekil **2.2.** Annexin V ve 7-AAD boyama ile canlılık ve apoptoz tespiti

Şekil 2.3. Floresein izotiyosiyanat'ın molekül yapısı

Grafik 3.1. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 48, 72 ve 96. saatteki % canlılıkları

Grafik 3.2. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 48 ve 72. saatteki % canlılıkları

Grafik 3.3. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album L.* ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 72. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 1090 μg/ml) (p <0,001).

Grafik 3.4. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 48. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC50: 413,6 µg/ml)

Grafik 3.5. A549 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.

Grafik 3.6. IC50 dozunda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 72. saatteki apoptoz grafikleri.

Grafik 3.7. HEK-293 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.

Grafik 3.8. IC50 dozunda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 48. saatteki apoptoz grafikleri.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Viscum album L. Ekstraktının İnsan Akciğer Kanser Hücre Hattında (A549) Proliferasyon Ve Apopitoz Üzerine Etkisi

Fadime OVALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

Akciğer kanseri dünya çapında önemli ve yaygın hastalıklardan biridir. Akciğer kanserinde hastalığın tipi ve evresine göre cerrahi müdahale ya da kemoterapik ilaçlar ile tedavi uygulanabilmektedir. *Viscum album* L. uzun yıllardan beri hipertansiyon, diyabet, artrit, viral enfeksiyonlar, enflamasyon, kanser, sarılık, astım, epilepsi, infertilite gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Yaptığımız bu tez çalışmasında, *Viscum album* L. ekstraktının, insan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde, apopitoz ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Hücre proliferasyon testi MTT yöntemi ile, apopitoz analizi ise Annexin V yöntemi ile Muse flow sitometre cihazında çalışılmıştır. *Viscum album* L.'nin etanol ekstraktı elde edilip A549 ve HEK-293 hücrelerine uygulanmıştır. A549 ve HEK-293 hücrelerine 1600,1400,1200,1000 µg/ml konsantrasyonlarda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış ve MTT yöntemi ile proliferasyon analizi yapılmıştır. A549 hücreleri için IC_{50} değeri 72. saatte 1090 µg/ml, HEK-293 hücrelerinde ise IC_{50} değeri 48. saatte 413,6 µg/ml olarak bulunmuştur. Muse/Flow sitometri cihazında Annexin V yöntemi ile A549 hücrelerinin ve HEK-293 hücrelerinin apopitoz analizleri yapılmıştır. Elde edilen IC_{50} konsantrasyonunda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış A549 hücreleri yaklaşık %80 oranında özellikle geç apopitoza gitmiştir. A549 hücrelerine benzer şekilde HEK-293 hücreleri de daha çok geç apopitoza gitmiştir. *Viscum album* L. ile yapılan diğer çalışmalarda çoğunlukla *Viscum album* L. ekstraktı hücre proliferasyonunu inhibe etmiş ve hücreleri apopitoza götürmüştür. Fakat yapılan çalışmaların hiçbirinde *Viscum album* L. ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisi araştırılmamıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre *Viscum album* L. bitkisinin doğrudan takviye tedavi olarak kullanılamayacağı ve ileri moleküler araştırmalarla etki mekanizmasının aydınlatılmasının yapılacak olan diğer çalışmalara yol gösterici nitelikte olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri; Apopitoz; Proliferasyon; *Viscum album* L.

SUMMARY

T. C.

SELCUK UNIVERSITY

INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

The Effect of *Viscum album* L. Extract on Human Lung Cancer Cell Line (A549) On Proliferation and Apopitosis

Fadime OVALI

MASTER THESIS

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY

Assoc. Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

Lung cancer is one of the most important and common diseases worldwide. Depending on the type and stage of the disease, lung cancer can be treated with surgical intervention or chemotherapeutic drugs. *Viscum album* L. has been used in the treatment of diseases such as hypertension, diabetes, arthritis, viral infections, inflammation, cancer, jaundice, asthma, epilepsy, infertility for many years. In this thesis study, we aimed to investigate the effect of *Viscum album* L. extract on apoptosis and cell proliferation in A549 cells, a human lung cancer cell line. Cell proliferation test was studied by MTT method, and apoptosis analysis was studied with Annexin V method in Muse flow cytometer device. Ethanol extract of *Viscum album* L. was obtained and applied to A549 and HEK-293 cells. *Viscum album* L. extract was applied to A549 and HEK-293 cells at concentrations of 1600,1400,1200,1000 µg / ml and proliferation analysis was performed by MTT method. The IC_{50} value for A549 cells was 1090 µg / ml at the 72nd hour, and 413.6 µg / ml for the HEK-293 cells at the 48th hour. Apoptosis analyzes of A549 cells and HEK-293 cells were performed with Annexin V method in Muse / Flow cytometry device. A549 cells, which were treated with *Viscum album* L. extract at the IC_{50} concentration obtained, underwent late apoptosis at a rate of approximately 80%. Similar to A549 cells, HEK-293 cells also underwent more late apoptosis. In other studies with *Viscum album* L. mostly *Viscum album* L. extract inhibited cell proliferation and led the cells to apoptosis. However, the effect of *Viscum album* L. extract on healthy cells was not investigated in any of the studies. According to these results, we think that *Viscum album* L. plant cannot be used directly as a supplementary treatment and that elucidation of its mechanism of action with advanced molecular research will guide other studies.

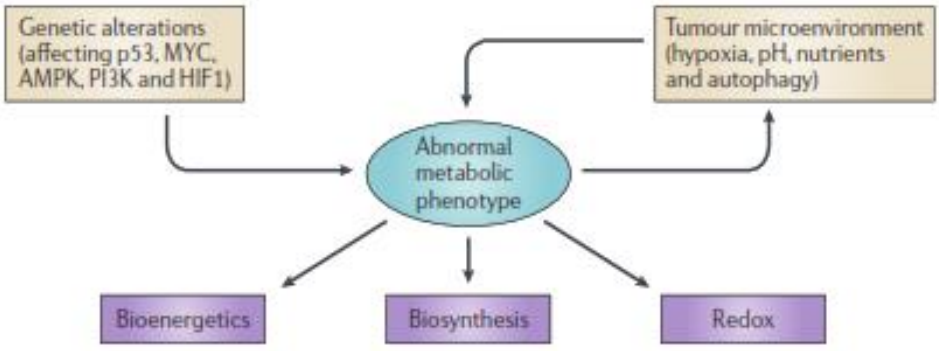
Keywords: Apoptosis; Lung cancer; Proliferation; *Viscum album* L.

1. GİRİŞ

Bir hücre veya hücre grubunun iç ve dış etkenler nedeniyle oluşan mutasyonlar sonucu, kontrol dışı çoğalmayla diğer dokuların aleyhine bir büyüme sergilemesi ve kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla primer lokalizasyonu dışındaki yerlere taşınarak oralarda da büyümeye devam etmesi ve yaşamı tehdit etmesi olayına "kanser" denir (Yöntem 2011).

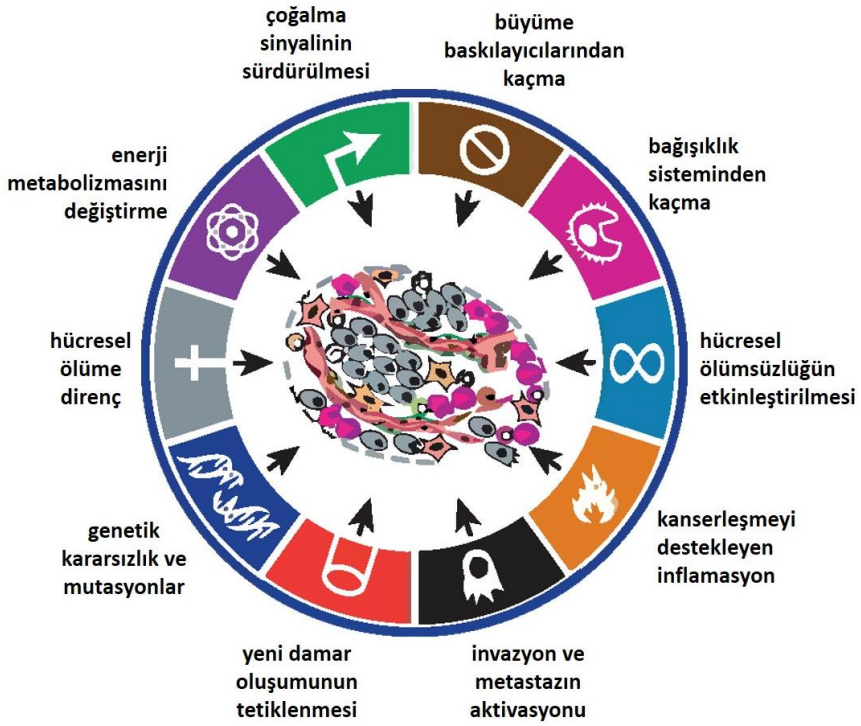
Son 30 yılda, onkogen devrimi kanser üzerine araştırmayı teşvik etti ve tümör hücrelerinin karakteristiği olan önemli fenotiplerin, çoklu sinyal yollarını değiştirmek için bir araya gelen bir dizi mutasyon olayından kaynaklandığı görüldü. Ayrıca, yüksek verimli sekanslama verileri sayesinde, tümör oluşumunda önemli rol oynayan mutasyonların, düşünülenden çok daha fazla ve heterojen olduğu ortaya çıktı. Artık kanser gelişimine katkıda bulunabilecek binlerce nokta mutasyonu, translokasyonu, amplifikasyonu ve delesyonu olduğu ve mutasyon aralığının histopatolojik olarak özdeş tümörler arasında bile farklılık gösterebileceği pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, birçok önemli onkojenik sinyal yolu, kanser hücresinin büyümesini ve hayatta kalmasını desteklemek ve tümör hücresi metabolizmasını adapte etmek için yakınlaşır. Ayrıca, bu metabolik değişikliklerin bazıları malign transformasyon için kesinlikle gerekli görünmektedir (Cairns ve ark 2011).

Kanser hücreleri, enerji durumunu korumak için hızlı ATP üretimi; makromoleküllerin artan biyosentezi; ve uygun hücresel redoks durumunun sıkışık bakımı gibi ihtiyaçları (Şekil 1.1) karşılamak için, dört ana makromolekül sınıfının metabolizmasında değişikliklere yol açar: karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve nükleik asitler (Cairns ve ark 2011).



Şekil 1.1. Tümör metabolik fenotipinin belirleyicileri (Cairns ve ark 2011).

Kanserin, büyümesini ve metastatik yayılımı sağlayan tamamlayıcı ve ayırt edici özellikleri (Şekil 1.2), kanser biyokimyasını anlamak için sağlam bir temel sağlamaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 1.2. Kanserin ayırt edici 10 özelliği (Hanahan ve Weinberg 2011).

1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri dünya çapında önemli ve yaygın hastalıklardan biridir. Akciğer kanseri, keratinosit karsinomu hariç teşhis edilen en yaygın kanser türü olup kansere bağlı ölümlerin en başında yer almaktadır. Akciğer kanseri, tüm kanser

türlerinin erkeklerde %17'sini kadınlarda %9'unu ve kansere bağlı ölümlerin %19'unu oluşturur (Cheng ve ark 2016). Akciğer kanseri son 100 yılın başlarında en nadir hastalık olarak gösterilirken, özellikle erkeklerde dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en sık görülen nedeni haline gelmiştir (Didkowska ve ark 2016).

İleri akciğer kanseri olan hastaların prognozu kötüdür ve sağkalım ortalama 1 yıldır (Lindeman ve ark 2018). Tıp dünyasının ilerlemesi ile akciğer kanseri olan hastaların ortalama 1 yıl olan sağkalım oranı artmaya başlamıştır. Buna rağmen 5 yıllık sağkalım halen düşüktür. Akciğer kanserinde yaş, cinsiyet, akciğer fonksiyonu, komorbidite, evre ve performans durumu sağkalımı etkileyen faktörlerdendir. Akciğer kanseri insidansı yaşa göre değişiklik göstermekte ve yaşlı hastalarda daha yüksektir. Yaşlı hastalarda akciğer kanseri insidansı daha yüksektir ve genç hastalara göre komorbidite prevalansı daha yüksektir. Komorbidite, sağkalım oranını çeşitli şekilde etkilemektedir. Kronik obtrüktif akciğer hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıkların akciğer kanseri olan hastalarda sağkalım oranını bağımsız bir şekilde etkilediği bulunmuştur. Komorbidite ayrıca, morfoloji, histoloji, farklılaşma, proliferasyon durumu ve kanserin büyüme hızını etkileyerek prognozun seyrini değiştirebilmektedir (Islam ve ark 2015).

1800'lü yılların sonlarından bu yana dünya çapında akciğer kanseri insidansı giderek artmıştır (de Groot ve ark 2018).

Akciğer kanseri insidansındaki potansiyel farklılıklar ülkeler arasındaki sosyoekonomik kalkınma düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Tüm akciğer kanseri vakalarının neredeyse yarısı (%49), toplum sağlığını, bilgisini ve yaşam standartlarının oluşturduğu bileşik bir önlem olan İnsani Gelişme Endeksi (HDI)'nde, orta ve düşük olarak sınıflandırılan ülkelerde görülmektedir (Cheng ve ark 2016).

Kadınlar ve erkeklerde öncelikle tütün içiciliğindeki tarihi, kültürel ve bölgesel farklılıklara bağlı olarak insidans eğilimleri ve coğrafi modeller farklılık göstermektedir. Akciğer kanseri için tümör gelişiminde rol oynayan ve hastaların yanıt verme kapasitesini etkileyen risk faktörleri, davranışsal, çevresel ve genetik risk faktörleridir. Akciğer kanseri olan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı on yıllar içinde minimal düzeyde değişmiştir (de Groot ve ark 2018).

Akciğer kanseri insidansı dünya çapında giderek artmaktadır. Tütün kullanımı ve hava kalitsindeki farklılıklar nedeniyle akciğer kanseri oranları dünya çapında değişiklik gösterebilmektedir. Erkeklerde kadınlara göre akciğer kanseri görülme oranları daha yüksektir. Ağırlıklı olarak sigara içme alışkanlığına bağlı olarak gelişmiş ülkelere göre daha az gelişmiş ülkelerde akciğer kanseri oranları daha yüksektir. Kadınlarda da son yıllarda sigara içme alışkanlığının artmasıyla akciğer kanseri oranları giderek artmaya başlamıştır (de Groot ve ark 2018).

1.1.1. Akciğer Kanserinde Risk Faktörleri

Tütün ve Sigara Kullanımı

Sigara kullanımı akciğer kanserinde en büyük risk faktörü olarak gösterilmekte ve akciğer kanserlerinin %90'ından sigara kullanımı sorumlu tutulmaktadır. Tütün ilk başlarda tıbbi ve rütiel amaçlı kullanılırken daha sonra enfiye, pipo, puro gibi çeşitli kullanılarak hastalıklara karşı risk faktörü haline gelmiştir (de Groot ve ark 2018).

Sigara kullanımı erkeklerde akciğer kanseri ölümlerinin yaklaşık %80'ini, kadınlarda %50'sini oluşturmaktadır (Didkowska ve ark 2016).

Tütünün bağımlılık yapan bileşeni nikotindir. Nikotin, asetilkolin agonisti olarak hareket eden, sinir sistemindeki nAChR reseptörlerine bağlanan, sinir sisteminde nörotransmiterlerin kan dolaşımına salınmasını sağlayan doğal bir alkaloiddir. Aslında nikotinin kendisi kanserojen değildir fakat nikotinik reseptörleri upregül eder ve mevcut akciğer tümörlerinin ilerlemesini ve gen ekspresyonunda tütün bağımlılığını artıran değişikliklere neden olur (de Groot ve ark 2018).

Kirlilik ve Hava Kalitesi

1920'li yıllardan beri hava kalitesi akciğer kanseri için bir risk olarak görülmeye başlanmıştır. Hem dış hem de iç hava kalitesi olarak iki ana grupta değerlendirilmektedir (de Groot ve ark 2018). İç mekan hava kirliliği bazı bölgelerde sigara içmeyen kadınlar için risk faktörü oluşturmaktadır. Bu, kötü havalandırılan evlerde kömür, odun ve diğer yakıtların yakılması ve bazı rafine edilmemiş bitkisel yağlar kullanılarak yüksek sıcaklıklarda pişirmeden çıkan dumanlarla ilişkilidir (Malhotra ve ark 2016). Fosil yakıtların ve havadaki partikül maddelerin yanmasıyla oluşan kanserojenlerde dış hava kirliliğini oluşturmaktadır. Bu dış ortamdaki

atmosferik karsinojenler arasında PAH, kükürt dioksit ve eser metaller bulunabilmektedir. Bu karsinojenlere uzun süre maruziyetin olduğu mesleklerde akciğer kanseri riski artmaktadır (de Groot ve ark 2018).

Eğitim/Yaş/Cinsiyet

Sigara içimi, üniversite mezunlarında %9,1 iken eğitim düzeyi lise eğitiminden daha düşük olan bireylerde %32,1'dir. Akciğer kanseri insidansı eğitim düzeyi ile ters orantılıdır. Eğitim düzeyi arttıkça sigara içme alışkanlığı azalmakta ve sigara içen bireylerin sigarayı bırakma eğilimi artmaktadır.

Yaş ilerledikçe DNA hasarı ve telomerleri kısaltan biyolojik faktörler sebebiyle kansere yatkınlık artmaktadır. Akciğer kanseri olan vakaların yaklaşık yarısı (%53) 55-74 yaş arasındaki bireylerdir. Genç hastalarda genellikle çok az komorbidite vardır ve daha çok genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Tarihsel olarak erkekler kadınlara göre daha fazla sigara içtiği için mortalite ve insidans daha yüksektir. 20. Yüzyılın ortalarından sonra kadınlarda da sigara içmeye eğilim arttığı için akciğer kanseri insidansı da artmıştır. Sigara içen kadınlarda CYP1A1 geninin aşırı eskpresyonu, glutatyon S-transferaz M1 enziminin mutasyonu, p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyonları ve aşırı X'e bağlı gastrin salan peptit reseptörünün ekspresyonu gibi genetik mutasyonların daha yaygın olduğu saptanmıştır (de Groot ve ark 2018).

Asbest

Mesleki olarak kanserojenlere maruziyet, akciğer kanserlerinin %5-10'unu oluşturmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı asbesttir. Asbest, doğal olarak oluşan bir silikat mineral olup amfibol (amosite, krokidolit, trenolit) ve serpantin (krizotil) alt tiplerinden oluşmaktadır. Tüm asbest formları akciğer için kanserojendir ancak krizotilin kanserojen gücü diğer tiplerden daha düşüktür (Malhotra ve ark 2016, de Groot ve ark 2018).

Radon

Radon, yer kabuğundaki uranyumun çürümesi ile doğal olarak oluşan radyoaktif bir gazdır. Radon alfa parçacıkları yayar ve önce polonuma daha sonra

bizmuta bozunur. Topraktaki radon, akciğer kanseri için ikinci yaygın risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda uranyum madeninde çalışan yeraltı işçilerinin radon gazına maruz kalmalarıyla akciğer kanseri riskinin arttığı rapor edilmiştir. Radon gazına maruziyet, akciğer kanseri olan vakaların %10'unu oluşturmaktadır (de Groot ve ark 2018).

Vitamin A ve Eksikliği

Yapılan birçok çalışmada akciğer ve diğer kanserlerde, diyetle sebze alımı kanser riskini orta derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir. Diğer araştırmalarda β karotenin (Retinol veya vit A içeren retinoidlerin prekürsörü) akciğer kanseri riskini azalttığı öne sürülmüştür. Sigara içen bireylerde serum β karoten düzeyleri sigara içmeyen bireylere oranla daha düşüktür. Bunun sebebi β karotenlerin diyetle daha az alımı ve sigaranın absorbsiyon ve metabolizma üzerindeki etkileriyle açıklanmaktadır. Vitamin A'dan fakir diyetle beslenenlerin akciğer kanseri riski, vitamin A'dan zengin diyetle beslenenlere göre 4,6 kat daha fazladır.

Genetik

Sigara kullanımı akciğer kanseri birinci risk faktörüdür fakat sigara içen tüm bireylerde akciğer kanseri gelişmez. Bu da akciğer malignitesine genetik yatkınlığın olduğu hipotezini güçlendirir. Ailesinde akciğer kanseri öyküsü olan bireylerde akciğer kanseri riski 1.7 kat artış göstermektedir. Bazı genom çalışmaları akciğer kanseri ile 5p15, 15q25-26 ve 6q21 kromozom bölgelerini ilişkilendirmiştir. 5p15 bölgesi, hücre replikasyonunda yer alan telomeraz ters transkriptazını kodlarken 15q25-26 kromozomundaki mutasyonlar ise hem nikotin bağımlılığına hem de akciğer kanserine yatkınlığa bağlıdır. Protein sinyalini düzenleyen kromozom lokusu 6p21'dir (de Groot ve ark 2018).

Onkogenler

Akciğer kanseri riskinde, Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) sistemi ve Debrisoquin metabolik fenotipi kalıtsal faktör olarak ilişkilendirilmiştir. Her iki faktör de p450 sisteminin parçasıdır. AHH enzim sistemleri polisiklik aromatik hidrokarbonları ve arilaminleri güçlü karsinojenlere aktive edebilme yeteneğine sahiptir. Son yıllarda tütüne spesifik karsinojenler olan glutatyon S transferaz (GST-

M1), N asetil transferaz (NAT) ve NNK (CYPZD 6) üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır (Akkoçlu ve Öztürk 1999, Rikova ve ark 2007).

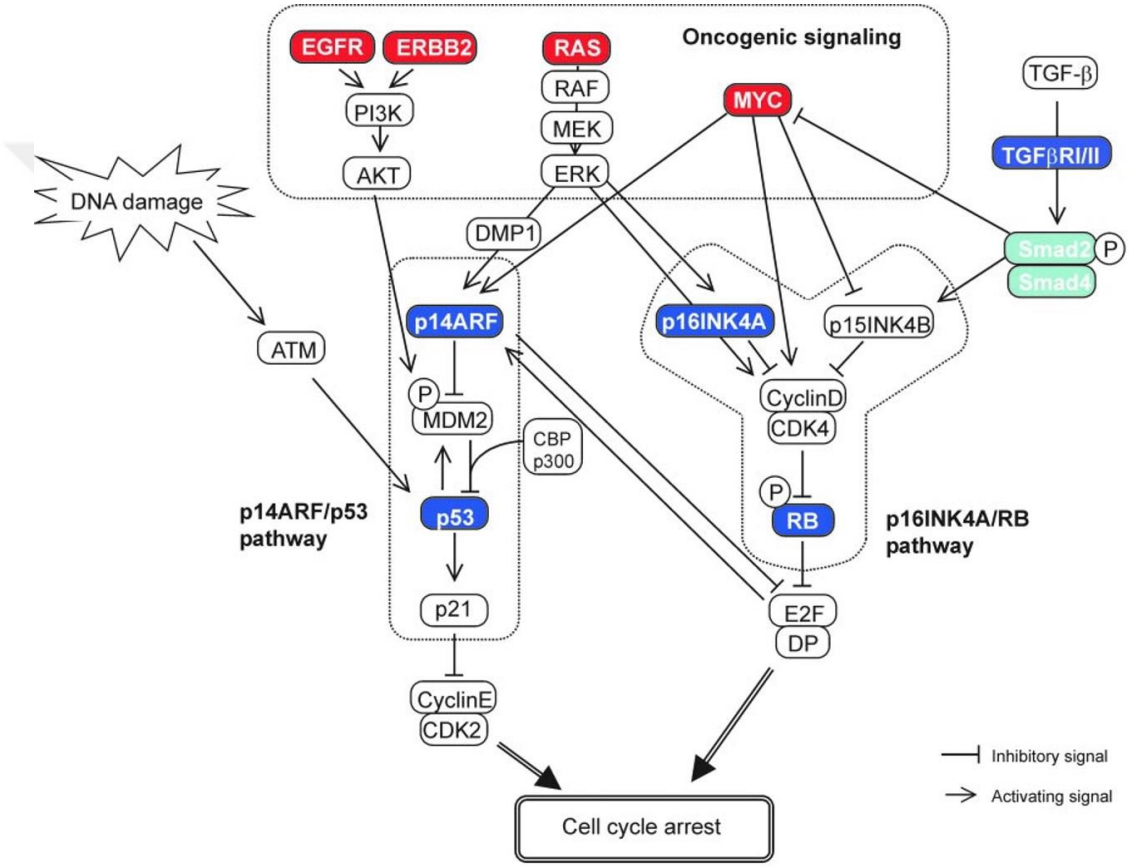
Akciğer kanserinde aktive onkogenlerin en önemli 6 familyası: ras (H-ras, K-ras, N-ras) ve myc (N-myc, C-myc, L-myc)'dir. Whang-Peng ve ark. 1982 yılında KHDAK hastalarında kromozom 3'ün kısa kolunda 3p (14-23) delesyonu bildirmişlerdir. İnsan kanserlerinde, kromozom 17'de bulunan p53 ve kromozom 13'deki Rb geni en sık bulunan tümör supresör genleridir. Hücre döngüsü boyunca progresyonu inhibe edip, büyümeyi kontrol eder (Akkoçlu ve Öztürk 1999). Normal p53, tümör baskılayıcı gen olarak işlev görür fakat çeşitli nokta mutasyonları onu resesif olandan dominant bir onkojene dönüştürebilir. Bu paradoks için açıklama, transfekte edilmiş gen tarafından kodlanan mutant p53'ün endojen p53 geninden türetilen vahşi tip proteine bağlanması ve inaktif hale gelmesi şeklinde yapılabilir. Aktifleştirici nokta mutasyonları, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş aminoasit rezüdülerini değiştirebilir. İnsan p53 geni, akciğer kanseri de dahil olmak üzere sık görülen alel kaybı bölgesi olan 17p kromozomunda lokalizedir. Allel kaybı, tümör baskılayıcılarının inaktivasyonu ile karakterizedir. Bu nedenle p53 sorumlu baskılayıcı gen olabilir (Iggo ve ark 1990).

1.1.2. Tümör Supresör Genler

Bazı tümör baskılayıcı proteinler (sadece BH3 gibi proteinler; ölümle ilişkili protein kinaz-1, DAPK1; PI3K, PTEN'yi antagonize eden fosfataz; yumrulu sklerozik kompleks 1 ve 2, TSC1 ve TSC2; yanı sıra LKB1 / STK1) otofajiyi indükler. Otofaji indüksiyonu için gerekli olan Beclin-1, haploinsif olarak etkili bir tümör baskılayıcı protein gibi davranır ve diğer gerekli otofaji aracıları (Atg4c, UVRAG ve Bif-1 gibi) çok iyi onosupresörlerdir (Maiuri ve ark 2009).

Akciğer karsinogenezi ve ilerleme süreçleri sırasında, çoklu tümör baskılayıcı genler inaktive edilir. Tümör baskılayıcı genleri inaktive eden değişiklikler genellikle iki olay içerir: bir alelin büyük bir kromozomal DNA segmentinin ve diğer alelde daha küçük bir mutasyonel veya epigenetik olayın delesyonu. Heterozigotluk kaybı (LOH) ile ilgili daha önceki çalışmalar, patogenezde yer alan tümör baskılayıcı genlerin lokalizasyonu hakkında ipuçları sağlamıştır. Açık akciğer kanserine dönüşmeden önceki erken lezyonlarda bile 3p, 9p21, 13q14 ve 17p13 delesyonları sıklıkla gözlenir.

3p'nin alelik kaybı, akciğer kanseri gelişimindeki en sık ve en erken olaylar arasındadır, bu da önemli bir tümör baskılayıcı genlerin bu bölgede bulunabileceğini düşündürmektedir. 9p21, 13q14 ve 17p13 bölgelerinin inaktivasyonu akciğer kanseri patogenezinde temel olarak önemli bir rol oynadığı gösterilen p16INK4A / p14ARF / p15INK4B, Retinoblastoma (RB) ve p53 genlerini barındırır. Bu tümör baskılayıcı proteinlerin fonksiyonel bağları, yani p14ARFp53 ve p16INK4A-RB yollarını oluşturdukları ve bunların kontrol noktalarının ve büyüme engelleyici yolların bileşenleri olduğu Şekil 1.3.'te gösterilmiştir (Osada ve Takahashi 2002).



Şekil 1.3. Akciğer kanserinde tümör baskılayıcı yollarındaki değişiklikler (Osada ve Takahashi 2002).

Kromozom 3p delesyonlarının eşlik ettiği birkaç kromozom 3p bölgesini içeren heterozigotluk kaybı (LOH), küçük hücreli akciğer kanserlerinin yaklaşık %100'ünde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %90'ından fazlasında tespit edilir (Zabarovsky ve ark 2002).

1.1.3. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Akciğer kanseri bronş ağacındaki farklı bölgelerde ortaya çıkabilen heterojen bir hastalık olup anatomik konumuna bağlı olarak farklı semptomlar ortaya çıkarabilir. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların %70'i evre III ve evre IV ile başvurmaktadır. Akciğer kanseri tipleri meydana geldikleri lobda multifokal olabilir, akciğer orijinine veya kontralateral akciğere yayılabilir (Lemjabbar-Alaoui ve ark 2015).

Kişiye özel tıbbın temelinde doğru histolojik sınıflama ve biyomarker bilgilerine dayanan bireysel akciğer kanseri tedavisi vardır. Bu nedenle akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması, tanı ve tedaviye multidisipliner yakaşımda önem arz etmektedir (Zheng 2016). Hedeflenen tedaviler kanser tipine, evreye ve spesifik mutasyonların varlığına göre uygulanmaktadır (Coudray ve ark 2018).

Akciğer kanserleri geleneksel olarak Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olarak iki ana gruba ayrılır. Bunlardan KHDAK'lar %80'ini KHAK ise %20'sini oluşturur. KHAK'leri genellikle agresif davranır ve çoğu zaman cerrahi tedaviye başvurulmazken KHDAK'lar cerrahi ve adjuvan tedavi kombinasyonu uygulanır (Petersen ve Warth 2016, Zheng 2016). Moleküler karakterizasyon projeleri, akciğer kanseri ve DNA alterasyonu, DNA metilasyonu, mRNA ekspresyonu, miRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonundaki farklılıklar sebebiyle yeni alt tipler tanımlanmıştır (Inamura 2017). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2015'de yeni alt sınıflandırmalar yapmıştır (Zheng 2016).

Tablo 1.1. WHO 2015 akciğer kanseri sınıflandırılması

<table>
<tr><td rowspan="3">1-Adenokarsinom
- Lepidik
- Papiller
-Mikro Papiller
-Katı
-İnvaziv
-Kolloid
-Fetal
-Enterik
-Minimal invaziv</td><td rowspan="3">5-Nöroendokrin Tümörler
-Karsinoid tümörler
+Tipik karsinoid
+Atipik karsinoid
-Küçük hücreli karsinom
-Büyük hücreli nöroendokrin karsinom</td><td rowspan="3">9-Tükürük Bezi Tipi Karsinomlar
-Mukoepidermoid karsinom
-Adenoid kistik karsinom
-Epitelyal miyoepitelyal karsinom</td><td>13-Metastatik Tümörler</td></tr>
<tr><td>14-Pulmoner Blastoma</td></tr>
<tr><td>15-Karsinosarkom</td></tr>
<tr><td>2-Skuamöz Hücre Karsinoması</td><td>6-Büyük Hücreli Karsinom</td><td>10-Mil Hücreli Karsinom</td><td rowspan="3">16- Diğer Karsinomlar
-Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
-NUT karsinomu</td></tr>
<tr><td>3-Adenoskuamöz Karsinom</td><td>7-Pleomorfik Karsinom</td><td>11-Dev Hücreli Karsinom</td></tr>
<tr><td>4-Mezenkimal Tümörler</td><td>8-Lenfohistiyositik Tümörler</td><td>12-Ektopik Menşeli Tümörler</td></tr>
</table>

Adenokarsinoma

Adenokarsinoma, KHDAK'nin %60'ını, akciğer kanserlerinin %40'ından daha fazlasını ve cerrahi olarak rezeke edilen vakaların %70'inden fazlasını oluşturan en yaygın akciğer kanseri alt tipidir. Genellikle santral fibrozis ve plevral büzüşmeli periferik yerleşimli bir kitle meydana getirir. Akciğer kanseri adenokarsinomu, glandüler farklılaşma veya müsin üretimi ile malign bir epitelyal neoplazmdır. Bu tür morfolojik özellikler tespit edildiğinde tümör, küçük biyopsi örneklerinde bile adenokarsinom olarak tanımlanabilir. Adenokarsinom hücreleri çoğunlukla pnömositik belirteçleri eksprese eder. Adenokarsinom vakalarının %85'inden daha fazlasında TTF-1 ve NapsinA eksprese edilir ve sınırlı biyopsi örnekleme materyalinde veya adenokarsinoma farklılaşmasının belirteçleri olarak iş görebilir (Zheng 2016). Tüm adenokarsinom vakalarının çoğu farklı paternlerden oluşur ve yalnızca <%10'u alt tiplemede morfolojinin önemini bulanıklaştıran saf bir patern gösterir (Petersen ve Warth 2016).

Squamöz Hücreli Karsinoma

Squamöz hücreli karsinoma (SqCC) tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-30'unu oluşturmaktadır (Lemjabbar-Alaoui ve ark 2015). Son yıllarda sigara içme davranışındaki değişiklikler sebebiyle insidansları azalmıştır (Zheng 2016). SqCC ana broşlarda ortaya çıkıp karinaya doğru ilerler (Lemjabbar-Alaoui ve ark 2015). SqCC genellikle büyük hava yolları boyunca lokalize olur ve büyük boyuta ulaştığında boşluklar meydana getirebilir. SqCC karakteristik olarak, mikroskobik incelemede keratinizasyon ve hücreler arası köprüler ve katı bir iç içe büyüme paterni gösterir (Zheng 2016).

SqCC histomorfolojik olarak farklılaşmaya dayanan 2004 WHO sınıflandırmasına göre alt gruplara ayrılır. Buna göre SqCC, papiller, berrak hücre, küçük hücre, bazaloid ve alveolar dolgu olarak alt gruplara ayrılmıştır. Tümör sınıflandırmaları tedaviye karar vermek için kolay ve tekrarlanabilir olması gerektiğinden 2015 WHO sınıflandırmasında alt varyantlar azalmıştır (Petersen ve Warth 2016). 2015 WHO sınıflandırılmasında SqCC'ler, keratinize edici, keratinize edici olmayan ve basaloid olarak sınıflandırılır. Basaloid SqCC immunohistokimyasal olarak P40, CK5/6 ve p63 gibi SqCC markerları gösteriri ve bu nedenle SqCC'nin lat grubu olarak kategorize edilir (Inamura 2017). SqCC için sağkalım oranı adenokarsinomaya göre daha yüksektir (Zheng 2016).

Nöroendokrin Tümörler

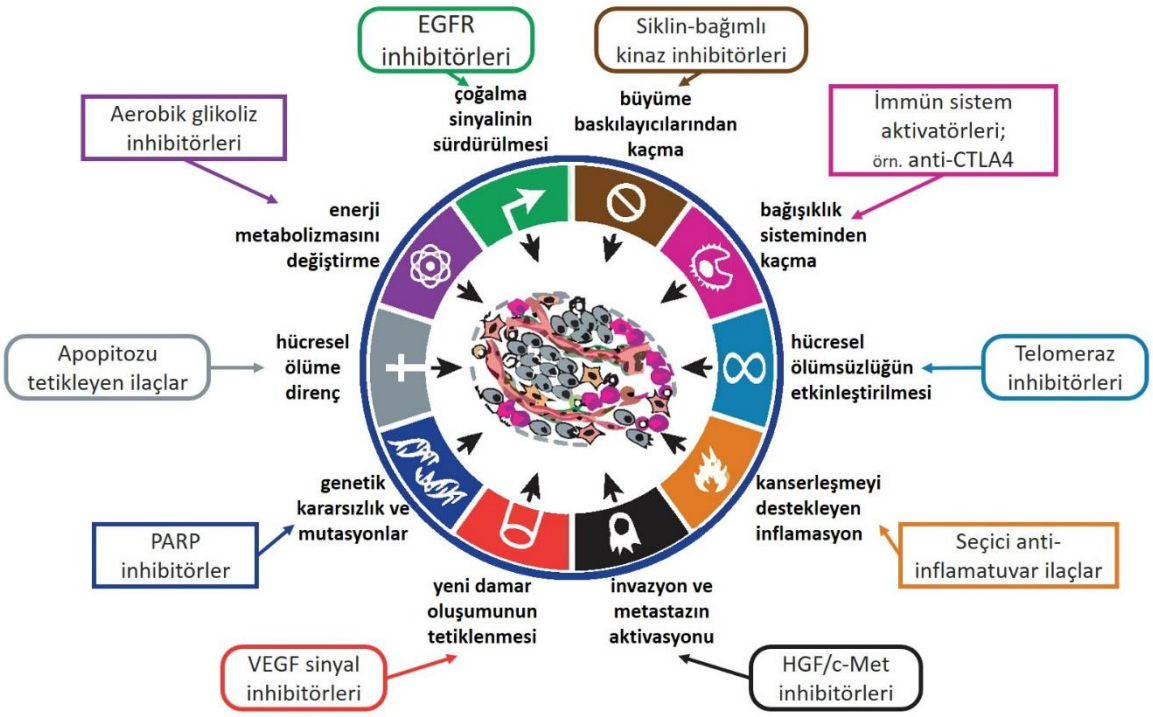
2015 WHO sınıflandırmasında nöroendokrin tümörler olarak yeni bir kategori oluşturulmuştur (Inamura 2017). Nöroendokrin tümörler akciğer kanserlerinin yaklaşık %20-25'ini oluşturur. Ortak morfolojik, immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel özellikleri diğer akciğer tümörlerinden ayrımlarında önemlidir. Organoid büyüme paterni, ince taneli kromatin paterni ve ayırt edici nöroendokrin marker ekspresyonu bu özellikler arasındadır. Kromogranin A, sinaptofizin ve CD56 yaygın nöroedndokrin markerlar arasındadır. Bu tümör grubunda heterojen farklılaşma derecesi vardır. İyi farklılaşmış tümörler fark edilebilir nöroendokrin farklılaşma özelliklerinin çoğunu veya tamamını korurken zayıf farklılaşmış tümörler çoğunu koruyamaz. Bu histolojik farklılık proliferasyon oranı ile örneklendirilir ve bu da tümör agresifliği ve prognoz ile bağlantılıdır (Zheng 2016).

Büyük Hücreli Karsinoma

Büyük hücreli karsinomlar (LCC) akciğer kanserlerinin %3'ünden daha azını oluşturmaktadır. LCC'ler köken spesifik farklılaşmasından yoksun olan, adenokarsinoma, SqCC ve nöroendokrin tümörlere benzer morfolojik ve immunohistokimyasal özellikleri göstermeyen az sayıda KHDAK vakasını temsil etmektedir. LCC genellikle periferik yerleşimli, hacimli ve nekrotik morfoloji sergiler. (Petersen ve Warth 2016, Zheng 2016).

1.1.4. Tedavi

İnsan kanserlerini tedavi etmek için mekanizmaya dayalı hedefli tedavilerin tanıtımı, kanser patogenezinin mekanizmalarına yönelik araştırmaların ilerlemesi olarak gösterilmiştir. Hedeflenen terapötiklerin hızla büyüyen donanımı, Şekil 1.4.'de sunulan örneklerde gösterildiği gibi, bir veya daha fazla ayırt edici özellik üzerindeki etkilerine göre kategorilere ayrılabilir . Gerçekten de bu ilaçların gözlenen etkinliği, her durumda, belirli bir yeteneğin bir validasyonunu temsil eder.



Şekil 1.4. Kanser Belirteçlerinin Terapötik Hedeflemesi (Hanahan ve Weinberg 2011).

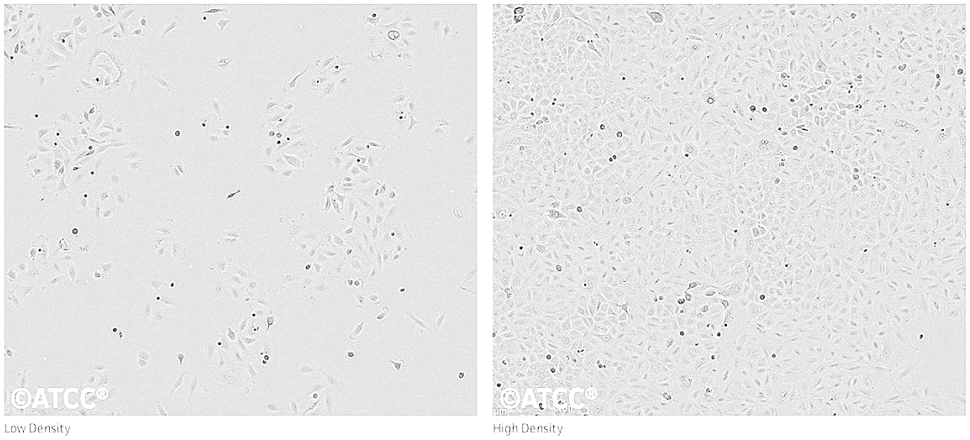
İleri akciğer kanseri olan hastalarda prognoz kötüdür ve sağkalım ortalama 1 yıldır. EGFR, ALK ve ROS1 genlerindeki değişiklikleri aktive etmek gibi belirli spesifik moleküler değişiklikleri bulunduran birçok hasta için, özellikle adenokarsonamada hedeflenen tirozin kinaz inhibitörü (TKI) tedavisi sağkalım ve kalitede önemli rol oynar. Buna göre moleküler değişikliklerin tipik olarak görüldüğü ileri akciğer kanseri olan hastalar, tanımlama için gerekli moleküler testleri almalı ve uygun hedeflenmiş tedaviler uygulanmalıdır (Lindeman ve ark 2018).

Akciğer kanserinde hastalığın tipi ve evresine göre cerrahi müdahale ya da kemoterapik ilaçlar ile tedavi uygulanabilmektedir. Kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi gibi modern tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin olması sebebiyle geleneksel olarak pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan tıbbi bitkilerin antikanser özelliği ile ilgili çalışmalar yapılmış ve kanser tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Yaptığımız bu tez çalışmasında, uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Viscum album* (ökse otu) bitkisinin, akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde proliferasyon ve apopitoz üzerine etkisini inceledik.

1.2. A549 Hücre Hattı

Çok sayıda akciğer kanser hücre hattı oluşturulmuştur. Bunlardan A549 hücre hattı 1973'te pulmoner adenokarsinomdan izole edilmiştir. Son yıllarda bu hücre hattı büyük oranda incelenmiştir. A549 hücre hattının mikroskobik görünümü Şekil 1.5.'te gösterilmiştir. A549 hücre hattının, üç solunum yolu müsin geni (MUC5AC, MUC1 ve MUC5B), p53, sitokeratinler, tip I ve II östrojen bağlanma yerleri ve diğer antijenleri ifade ettiği bilinmektedir. A549 hücre hattı, insan akciğerinin Alveolar Tip II (ATII) pnömositlerini temsil etmesi olarak karakterize edilmiş ve bu sebeple uzun yıllardır solunum araştırmalarında önemli rol oynamıştır. Pulmoner epitel, tip I ve tip II olmak üzere iki ana tiptedir. Tip I hücreler, pulmoner epitelyumun yüzey alanının yaklaşık %96'sını kaplar ve bölünme yeteneği yoktur. Tip II hücreler, alveolüsün yüzey alanında daha az yer kaplar ve daha fazla ve farklı fonksiyonlara sahiptir. Bu fonksiyonlardan biri, katmanlı gövdeler denilen organellerde depolanan yüzey aktif madde üretmektir. Bazı çalışmalarda tip II hücrelerin tip I pulmoner epitel hücreleri için öncü hücreler olduğu gösterilmiştir. A549 hücre hattı in vitro olarak; farklı alt popülasyonları elde etmek, morfolojik yönlerini ve büyüme davranışlarını incelemek, olası tümör oluşumunu belirlemek ve monoklonal antikor paneli ile antijenik

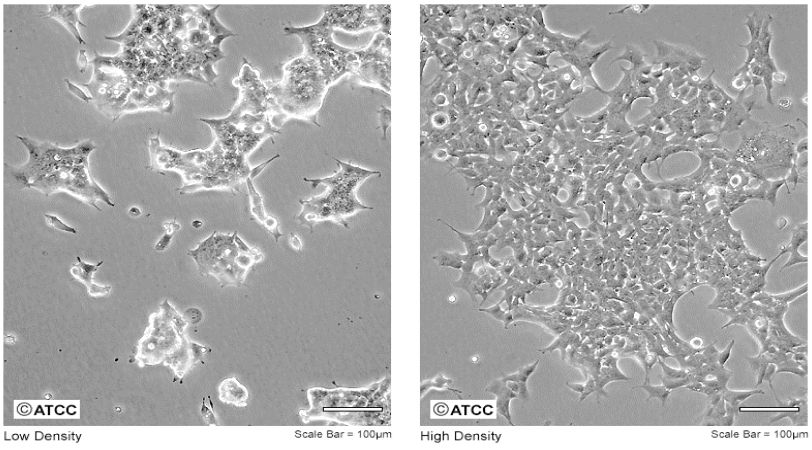
ekspresyonlarını araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca A549 hücre hattının gen ekspresyonunun geniş kapsamlı RNA mikrodizi analizi bulunmaktadır (Foster ve ark 1998, Croce ve ark 1999, Cooper 2012).



Şekil 1.5. A549 hücrelerinin düşük ve yüksek yoğunluklu mikroskop görüntüleri (ATCC).

1.3. HEK-293 Hücre Hattı

Morfolojisi epitel olan HEK-293 hücre hattı 1973 yılında normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin Adenovirüs-5 ile transforme edilmesiyle üretilmiştir. Hücrelerin ışık mikroskobundaki morfolojisi birbirlerine ağımsı bağlantılar ile bağlanmış yassı adherent tipindedir (Şekil 1.6) (Kalkan ve ark 2018).



Şekil 1.6. HEK-293 hücrelerinin düşük ve yüksek yoğunluklu mikroskop görüntüleri (ATCC).

1.4. *Viscum album* L.

Viscum album, eski Yunan ve Roma zamanından beri tıbbi amaçlar için kullanılmıştır (Piotrowski 2002). 20. yy'ın başlarında onkolojide ökse otu tanımı ilk olarak filozof Rudolf Steiner tarafından yaplmıştır.*Viscum album*, taksonomik olarak Santalaceae ile gruplandırılmış, Loranthaceaeeste familyasına ait, konakçı bitkinin gövdesinde yaşayıp kolayca kırılan düğümlerde yoğunlaşan, semiparazit otsu bir bitkidir (Trifunschi ve ark 2015, Felenda ve ark 2019). Semiparazit olmasının sebebi, fonksiyonel klorofil içerip fotosentez yapmasıdır (Suheel Ahmad ve Sultan 2018). Yaprak dökmeyen bir bitki olarak ökse otu, sadece mineraller ve su için konakçıya bağlı iken, karbonhidratını kayışa benzer dikdörtgen yapraklarını kullanarak sentezleyebilir (Ojezele ve ark 2016). Kökü olmadığı için houstrium denilen emeçlerle konakçı bitkinin ksilem demetinden ihtiyacı olan inorganik besinleri alır(Üstüner ve ark 2015). Karbonhidratların ve aminoasitlerin üçte biri konakçı ağaçtan ve söğüt kabuğundan, salisin veya kafeik asit gibi, spesifik içeriklerden gelir (Felenda ve ark 2019).

Viscum album L. türüne ait 3 alt tür tespit edilmiştir. Bunlar; *Viscum album* L. ssp album, *Viscum album* L. ssp abietis, ve *Viscum album* L. ssp austriacum olarak bildirilmiştir. Bu alt türler ülkemizde ahlat, alıç, akasya, armut, ayva, badem, elma, erik, kayısı, kiraz, vişne gibi meyve ağaçlarında, köknar, çam gibi iğne yapraklı ağaçlarda yetiştiği görülmüştür. Erik ve badem ağacı üzerindeki görüntüsü Şekil 1.7. de gösterilmiştir. *Viscum album* ismi, meyvelerinin yapışkan visköz özelliği nedeniyle ve beyaz renkli olmasından dolayı verilmiştir. Ülkemizde kuşları yakalamak amacıyla ökse yapımında kullanılmasından dolayı ökse otu adını almıştır (Üstüner ve ark 2015).



Şekil 1.7. Erik ve badem ağacı üzerinde *Viscum album* L.bitkisi (Üstüner ve ark 2015).

Viscum album L. ortaçağda egzama, ülser, yanıklar ve yaraların tedavisinde etkili olan ve tıbbi amaçlı kullanılan bir bitkidir (Urech ve ark 2005).

1917 yılında hastalara, kanser tedavisi için ökse otu preparatları verilmiş ve ayrıca arteriyoskleroz, hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıklara karşı da ökse otu kullanılmıştır (Felenda ve ark 2019).

Ülkemizde *Viscum album* L. özellikle Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinde hipertansiyona karşı kullanılmıştır (Deliorman ve ark 2000).

Viscum album L. genellikle hipertansiyon, diyabet, artrit, viral enfeksiyonlar, enflamasyon, kanser, sarılık, astım, epilepsi, infertilite gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde adjuvan kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Onay-Ucar ve ark 2006, Choudhary ve ark 2010, Kim ve ark 2017, Schad ve ark 2017, Dai ve ark 2019).

Viscum album L. semiparazit bir bitki olduğu için konakçı bitkinin gelişimini olumsuz etkiler. Konakçının yüksekliğini, çapını, odun kalitesini ve miktarını etkilemesinin yanı sıra, meyve veriminin düşmesine, konakçının böcekler veya mantarlar tarafından saldırıya uğramasına da sebep olur (Suheel Ahmad ve Sultan 2018).



Şekil 1.8. *Viscum album* L. çiçeği (Heide-Jørgensen 2015).

Ökse otunun boyu 30-100 cm'ye kadar çıkabilmektedir. Yaprakları 3-5 damarlı, küt uçlu,kalın, pürüzsüz ve oval şekildedir. Kompakt sivri uçlu çiçekler sarı-yeşilimsi renktedir (Şekil 1.8). Sonbaharın sonlarında ve kış aylarında (ekim-aralık) beyaz mumsu meyveler olgunlaşır. Meyveler gelişimin başlangıcında yeşil, olgunluğa ulaştığında beyazımsıdır (Şekil 1.9). Olgunlaşmış meyveler yapışkan ve yarı saydam hamurumsu bir madde ile doludur ve tek tohumludur. Tohumlar "viscin"adı verilen yapışkan malzeme ile kaplıdır. Viscin, selülozik iplikçiklerin ve mukopolisakkaritlerin karmaşık bir yapışkan karışımıdır. Yıl boyu hasat yapılabilir ancak uzmanlar tıbbi kullanımlarda en verimli dönemin kış ayları olduğunu bildirmiştir (Trifunschi ve ark 2015, Suheel Ahmad ve Sultan 2018, Felenda ve ark 2019).



Şekil 1.9. *Viscum album* olgunlaşmamış (yeşil) (Prof. Dr. Osman Tugay) ve olgunlaşmış (beyaz) meyvesi (Heide-Jørgensen 2015).

Ökse otunun verimli çimlenmesi birçok faktöre bağlıdır. Sıcaklık, ışık bu faktörlerden en önemlileri arasındadır. Çimlenme için optimum sıcaklık 15-20 ^{o}C'dir. 4-5 ^{o}C' de çimlenme süresi uzarken (10-31 gün), 18-32 ^{o}C'de tohumlar 2-8 günde

filizlenmeye başlar. Yapılan araştırmalar ökse otunun, kalsiyum bakımından zengin toprakta yetişen ve yumuşak ağaç türlerinde daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Pek çok hayvan türü beslenme için ökse otuna bağımlıdır. Bu nedenle biyolojik çeşitlilik üzerinde olumlu etkileri vardır. Ormanlık ve diğer alanlarda çeşitli hayvanlar için yüksek kaliteli yiyecek ve yaşam alanı sağlamış olur. Ökse otu tohumları rüzgar ve kar gibi abiyotik faktörlerin yanı sıra özellikler kuşlar gibi hayvanların yardımıyla yayılır. Ökse otunun yayılımı daha çok kuşlar aracılığıyla olur (Şekil 1.10) ve yayılımı sağlayan yaklaşık 13 kuş türü olduğu tahmin edilmektedir. Tohumun etrafını saran viscin, tohumun gelecek konakçıya sıkıca tutunmasını sağlar. Tohumda her biri hipokotilini üreten ve konakçıya haustorium ile nüfuz eden iki yeşil embriyo vardır. Tohum çimlenir ve iki yeşil embriyo uzayarak Şekil 1.11. de de görüldüğü konakçıya nüfuz eder (Gołąbek ve ark 2017, Suheel Ahmad ve Sultan 2018, Felenda ve ark 2019).



Şekil 1.10. *Viscum album* L'nin kuşlar aracılığıyla yayılması (Heide-Jørgensen 2015).



Şekil 1.11. *Viscum album* L'nin haustorium ile yeni konakçıya tutunması (Heide-Jørgensen 2015).

1.4.1. *Viscum album* L.'nin Etki Mekanizması

Antitümör etkinin birkaç yolu vardır. Hücre döngüsünün ilerlemesinde, tümör hücreleri inhibe edilebilir ve hücre ölümü gerçekleşebilir. Antikanserojen tedavi ile hücre büyümesinin inhibisyonu veya endotel hücrelerin öldrülmesi ile anjiyogenez oluşumu engellenebilir. Anjiyogenezin inhibisyonu ile tümör hücresi, oksijen ve besin kaynağı açısından aç kalır ve büyüme hızında sınırlanma meydana gelir (Harmsma ve ark 2006).

- **Hücre Ölümü: Nekroz/Apoptoz:** Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere 2 ana grupta toplanabilir. Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle temasın kaybolması şeklinde olur. Apoptozda inflamasyon olmadan hücreler kendi kendilerini yok eder, genlerle düzenleme olur, programlıdır, RNA, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç vardır ve organizmada homeostazın korunması sağlanır. Hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketi azalır çünkü Na, K, Cl taşıyıcı sistem durmuştur. Böylelikle hücre büzüşür. Apoptotik uyarım alan hücrenin, hacmi yarıya iner, çevre ile bağlantıları kesilir ve mikrovillusları kaybolur. Hem normal hem de neoplastik dokularda görülür. Nekroz, inflamasyon yanıtının geliştiği, hücresel homeostazın hızla bozulduğu, ATP miktarının azaldığı patolojik hücre ölümüdür. Nekrozda hücre büzüşmesi yerine hücre şişmesi görülür. Hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs siklusu ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi ve çeşitli toksinler nekrozun nedenleri arasındadır (Tomatır 2003, Urech ve ark 2005).

- **Apoptotik Yollar:** Hücrelerin apoptoza gitmesinin birkaç yolu bulunur. Ölüm reseptör yolu ve mitokondriyal yol ana yollardandır. Ligandların hücre yüzeyinde ölüm reseptörleri ile etkileşimi sonucu ölüm reseptörü yolu aktif hale gelir. Bunun sonucunda kaspaz 8 aktive olur ve apoptotik süreçte down regülasyon ile diğer kaspazlar aktive edilir. Mitokondriyal yol ise mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ve sitokrom C'nin sitozole sızması ile gerçekleşir. Her iki yol da kaspaz 3'ün aktivasyonunda birleşir (Harmsma ve ark 2006).
- **Hücre Döngüsü Gecikmesi, Yaşlanma ve Mitotik Felaket:** Antikanserojen maddeler sadece apoptozu indüklemez aynı zamanda hücre döngüsünün ilerlemesinde tümör hücrelerini ya da endotel hücrelerini de inhibe edebilir. Bu da apoptoza, hücre döngüsü gecikmesine, yaşlanmaya veya mitotik felakete yol açabilir. Terminal büyüme durmasının fizyolojik programı hücre yaşlanmasıdır. Bu hücreler uyarılsa bile bölünemezler. Metabolik olarak aktif kalırlar ve tümör baskılayıcı ve tümör destekleyici aktiviteler ile salgılanan proteinleri üretebilirler. Mitotik felaket, hücre bölünmesinin yasak olduğu durumdur. Bunun nedeni birden fazla mikronükleusu olan hücrelerin oluşumuna neden olan kromozomların anormal dağılımıdır. Mitotik felakete uğrayan hücreler ölür. Mitotik felaket, tümör hücelerinin hücre döngüsüne anormal şekilde girmesinden dolayı gerçekleşebilir (Harmsma ve ark 2006).

1.4.2. *Viscum album* L. Bitkisinin Kimyasal Bileşimi

Viscum album L'nin kimyasal içeriği, konakçu ağacın türüne, hasat dönemine ve kullanılmadan önce bitkiye yapılan işleme göre değişiklik göstermektedir (Ojezele ve ark 2016). Yapılan çalışmalarla *Viscum album* L. ekstraktlarının, çeşitli sitokinlerin uyarılması, doğal öldürücü (natural killer-NK) hücrelerin aktivitesinin arttırılması, immunoadjuvan, antikanser, antimikotik, antibakteriyel, antiviral ve immunomodulatoaktiviteler gibi pekçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Yoon ve ark 2003, Vıcaş ve ark 2011).

Günümüzde kanser tedavisinin yan etkilerini azaltmak veya hastaların iyileşmesine yardımcı olmak için halihazır tedavilere ek olarak *Viscum album* L. preparatları kullanılmaktadır. (Ostermann ve ark 2020).

Yapılan birçok çalışmada *Viscum album* L. bitkisinin pekçok kimyasal bileşenleri izole edilmiştir. Bu kimyasal bileşenler arasında Tablo 1.2'de de gösterildiği gibi viskotoksinler, lektinler, alkaloidler, aminler, flavanoidler, organik asitler, terpenoidler, fenoller, lesitinler, triterpenler, polipeptitler, saponinler, kafeik asit, asetilkolin türevleri, C vitamini, histamin, reçineler, tiyoninler, kardenolitler bulunmuştur (Piotrowski 2002, Harmsma ve ark 2006).

Tablo 1.2. *Viscum album* L. bitkisinin kimyasal içeriği

1. Alkaloidler *Tiramin
2. Aminoasitler ve Türevleri *Arjinin *Asparagin *Prolin *Fenilalanin *Hidroksilizin *Histamin *1-Kinürenin *Sisteik Asit *GABA
3. Fenilpropanlar ve Glikozitleri *Fenilpropan *Kalopanaksin * D Koniferin *Siringin
4. Flavonoidler *Kersetin *Kersetin-3-ramnozit *Kersetin-3-arabinozit
5. Lignanlar
6. Organik Asitler *Kaffeik Asit *Klorogenik Asit *Miristik Asit *P-Kumarik Asit *Sinapik Asit *Şikimik Asit *Vanilik Asit *Protokateşik Asit
7. Proteinler *Lektinler *Viskotoksinler (Tiyoninler)
8. Rezinler
9. Şekerler ve Türevleri *Glukoz *Arabinoz *Ramnoz *Sukroz *Polisakkaritler *Seril Alkol *Mannitol *İnositol *Viscumitol (di-O-metil-inositol) *1-D-1-O-metil-muko-inositol
10. Terpenler ve Glikozitleri *Monoterpen Glikozitleri *Triterpenler *β Amirin *Oleonolik Asit
11. Vitaminler *C vitamini *α ve β-Karoten

Viscum album L.'nin fitokimyasal profili konakçu ağaca bağlı olarak değişmektedir. Hücre proliferasyonunda etkisi olup bir glikoprotein olan lektinler ve 5kDa'lık küçük bir protein olan viskotoksinler ana bileşenlerdir. Konakçu ağacın tipine bağlı olarak alkaloid konsantrasyonu genelde düşüktür. Bitki içeriğinde bulunan

fenolik bileşiklerin varlığı ile antioksidan kapasitesi artar (Vıcaş ve ark 2011). Yapılan çalışmalarla flavonoidler, fenol karboksilik asitler, fenilpropanlar ve lignanlar *Viscum album* L.'nin kardiyovasküler aktivitesinin türevleri olarak bildirilmiştir (Deliorman ve ark 2000). *Viscum album* L. ekstraktının antitümör aktivitesi, NK hücreleri, lenfokin ile aktifleşen öldürücü hücreler ve makrofajların sitotoksik aktivitesini arttırma kabiliyeti ile bağlantılıdır. *Viscum album* L. preparatlarının tümör hücrelerine karşı doğrudan sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir (Yoon ve ark 2003). Farmakolojik olarak *Viscum album* L.'nin en aktif ve kullanılan bileşiği, antiproliferatif, sitotoksik ve immunomodulatör etkileri olan lektinler ve viskotoksinlerdir. Lektinler, bitkinin gövde ve haustoriumunda bulunurken, viskotoksinler yapraklarda bulunur (Urech ve ark 2006, Felenda ve ark 2019).

1.4.3. Lektinler

Viscum album L.'nin ana bileşenlerinden olan lektinler, muz, buğday, mısır, fasülye ve yer fıstığı gibi pekçok bitkide de bulunmaktadır. İlk izole edilen lektin, hint yağı bitkisinin tohumlarından elde edilen yüksek toksisiteye sahip risindir (Felenda ve ark 2019). *Viscum album* L. lektinleri, IL-1, IL-6, IL-12 ve TNFα'nın salgılanmasını, makrofaj sitotoksisitesini, bağışıklık hücrelerinin fagositozunu uyarır, sitokin sekresyonunu arttırır, tümör hücreleri üzerinde büyüme engelleyici olarak rol oynar (Taraphdar ve ark 2001, Maier ve Fiebig 2002, Schad ve ark 2017, Melo ve ark 2018).

ML-1,mL-2 vemL-3 olarak bilinen üç lektinin moleküler ağırlıkları farklıdır.mL-1 yapısal açıdan risine benzeyen heterodimerik bir glikoproteindir.mL-1'in antitümör ve immunmodülatör etkileri çok sayıda incelenmiştir.mL-1, A ve B polipeptit zincirlerinden oluşur. Bu zincirler birbirine disülfit bağı ile bağlanmıştır. A zinciri RNA N-glikosidaz aktivitesine sahiptir. B zinciri ise karbonhidrat bağlanma (galaktoza özgü bağlanma alanı) özelliği ile donatılmıştır.

Lektinler eritrositleri veya agregat hücreleri kümeler ve protein sentezi inhibisyonuna yol açar. Apoptoz ve hücre siklusunun durmasını uyarır, anjiyogenezi ve hücre proliferasyonunu engeller (Maier ve Fiebig 2002, Piotrowski 2002, Felenda ve ark 2019).

1.4.4. Viskotoksinler

Viscum album L.' ana bileşiklerinden olan viskotoksinler ökse otunun yanısra, tahıl, yulaf, pirinç, arpa ve buğdayda da bulunur. Viskotoksinler genelde tohumların endosperminde ve birkaç graminea'nın bazı dokularında, ökse otunun ise yapraklarında bulunur. Viskotoksinler disülfit köprüleri içerir. Bugüne kadar viskotoksinin farklı formları izole edilmiştir. Bunlar, A1, A2, A3, B, B2,C1 olarak adlandırılmıştır. Bazılarının antimikrobiyal, fungisit ve hücrelerin RNA ve DNA'sı ile etkileşime girme özellikleri vardır. Viskotoksinlerin farklı tümör hücresi tiplerine karşı sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir (Piotrowski 2002, Felenda ve ark 2019).

Yaptığımız bu tez çalışmasında, *Viscum album* L. ekstraktının, A549 hücre hattında, apopitoz ve proliferasyon üzerine etkisini araştırdık.

1.4.5. Triterpenler

Pentasiklik triterpen asit ailesinin ökseotu bileşenleri (oleanolik asit, betulinik asit, ursolik asit) ayrıca sitotoksik anti-kanser aktivitesine sahiptir, ancak düşük çözünürlükleri nedeniyle sulu ökseotu ekstraktlarında oluşmazlar. Klinik öncesi çalışmalar, betulinik asit veya oleanolik asit gibi triterpen asitlerin anti-enflamatuar ve anti-kanserojen özelliklerini kanıtlamıştır. Ayrıca, oleanolik asit ve türevlerinin çeşitli malign hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Lektinler ile indüklenen apoptoza benzer şekilde, oleanolik asit kaynaklı apoptozun açıklanan ana yolları, Akt, MAPK-, ERK-, JNK-sinyal yollarını içerir. Hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptotik hücre ölümünün indüksiyonu, lösemi hücrelerinde de gösterilmiştir. Yeni sonuçlar, in vitro ve in vivo insan melanom hücre dizilerinde kombine oleanolik ve ursolik asitlerin sinerjistik bir etkisini göstermektedir (Delebinski ve ark 2015).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), GoldBio Catalog # T-030 [CAS 298-93-1, mw = 414.32 g/mol])Apopitoz kiti
- DMEM besiyeri
- FBS: Fetal Bovin Serum European Grade Heat Inactivated (BIO-IND, BI04-127-1B) (100ml)
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Strptomycin Solüsyon 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND, BI03-031-1C) (20mL)
- Glutamin-L-glutamin Solüsyonu, 29.2 mg/ml in Saline) (200 mmol) (BIO. IND,BI03-020-1B) (100mL)
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol Biological Industries Kibutz Haemek: (BIO. IND, BI03-053-1B) (100mL)
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650-100ml
- Trypan Blue
- Etil alkol

2.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Gereçleri

- Çalışmalarda steril ortamı sağlamak için hücre kültürü laminar akım kabini, Steril VBH Compact
- Hücrelerin büyümesi için gerekli sıcaklık ve CO_2'li inkübatör, SANYO O2/CO2 INCUBATOR MCO-175M
- Hücrelerin büyümesini ve morfolojisindeki değişiklikleri gözlemlemek için kullanılan inverted mikroskop, Leica Dmil Led
- Spektrofotometre
- Çalışmada kullanılan çözelti ve ekstrakt solüsyonlarının saklandığı buzdolabı, (+4 ˚C ve -20˚C): ALTUS AL 302

- Doku preparatlarının ve fraksiyonlarının saklandığı derin dondurucular (-20).
- Soğutmalı yüksek hız santrifüj (20000 Rpm), Sigma 3K30
- Saf su sistemi
- Sterilizasyon için otoklav
- pH-Metre
- Otomatik pipetler
- Ultrasonikatör
- Vorteks, Heidolph, Almanya
- Su banyosu, Wise Bath fuzzy systems
- Hücrelerin uzun süre saklanabilmesi için sıvı azot tankı, LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- Steril filtre
- 96 kuyucuklu steril plaka: Corning® Costar® 96-well plate
- ELISA Reader: CLARIOstar
- Falcon tüp 15mL/ 50mL
- Kriyo tüp
- Petri Kabı: Corning® 100x20mm Lot: 430167
- Serolojik pipet: (5 ve 10mL)
- Steril filtre: 0,22 µm
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (Rayto Microplate Washer RT-2600, Rayto Microplate Reader RT-2100C marka, Çin)
- Flow sitometre

2.2.Yöntem

2.2.1. *Viscum album* L. Bitkisinin Ekstraksiyonu

- *Salix alba* L. (söğüt ağacı) bitkisi üzerinden toplanan 30 gr ökse otu ve 300mL etanol (çözücü) balon joje içinde 50-55 ºC'de Soxhlet ekstraksiyon cihazında 8 saat süre ile ekstraksiyona tabi tutuldu.
- Ekstraksiyon sonrası ekstrelerdeki çözücüler 45 ºC'de Rotary Evaporator cihazı ile uzaklaştırıldı.

- Balonlarda kalan ekstreler, ultrasonikatör kullanılarak 37 ^{o}C'de 5 dk süre ile minimal miktarda çözücü ile (4-5 mL etanol) sonike edilerek flakonlara aktarıldı.
- Flakonlar 55 ^{o}C'de ağzı kapalı su banyosu üzerinde 1 hafta bekletilerek çözücülerin uçması ve ekstrelerin kuruması sağlandı.

2.2.2. Besiyeri Hazırlama

500 mL DMEM içine steril filtreden geçirilerek, %10'u kadar FBS, %1'i kadar penisilin-streptomisin eklendi ve çalkalandı.

2.2.3. Sıvı Azot Tankından Hücre Çıkarma

-80 ^{o}C'de vialler içinde saklanan donuk halde olan hücreler çıkarılıp 10-12 saniye 37 ^{o}C benmaride tutuldu. Vialde bulunan hücrenin üzerine 1mL DMEM eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı. Boş falkona 5-6 mL besiyeri koyuldu. Falkondaki besiyerinin içine vialdeki hücre besiyeri karışımı eklendi. Dondurma işlemi sırasında kullanılan DMSO'nun uzaklaştırılması için 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Üstteki supernatant kısım atıldı. Altta kalan hücre pelletinin üzerine 1mL besiyeri eklendi. Petri kabına 6-7 mL besiyeri koyulup falkondaki hücre petriye ekildi. 37 ^{o}C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edildi. 24 saatte bir hücrelerin besiyerleri değiştirilerek çoğalmaları ve yüzeye tutunmaları sağlanmıştır.

2.2.4. Hücre Dondurma

- %90 FBS ve %10 DMSO'dan oluşan dondurma solüsyonu hazırlandı.
- İnkübatörden çıkarılan hücrelerin besiyerleri atıldı.
- 1,5mL PBS ile yıkandı.
- 1,5mL Tripsin eklendi ve 5 dk inkübe edildi.
- Falkona 3mL besiyeri koyuldu ve üzerine tripsin eklenen hücreler aktarıldı.
- 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Supernatant kısmı atıldı.
- Altta kalan hücre pelletine 600 µL dondurma solüsyonu eklenip hafif pipetaj yapıldı.
- Viale aktarıldı.

- -80 ^{o}C' ye kaldırıldı.

2.2.5. Hücre Pasajlama

- DMEM besiyri, PBS ve Tripsin-EDTA su banyosunda 37 ^{o}C'ye getirildi.
- İnkübatörden alınan hücreler mikroskopta incelendi.
- Hücre tabakasına pipeti temas ettirmeden besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı.
- Petrinin alt köşesine PBS eklendi, yüzey yıkandı ve ardından PBS uzaklaştırıldı.
- Ortama pipet ile Tripsin-EDTA eklendi ve petri, inkübatörde 5 dk inkübe edildi.
- Mikroskopta hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- Hücreler falkona aktarıldı ve 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Supernatant kısmı atıldı. Pellet kısmın üzerine 2mL besiyeri eklenip pipetaj yapıldı.
- 2 ayrı petri kabına ayrı ayrı 6 mL besiyeri koyuldu.
- Petri kaplarına ayrı ayrı 1'er mL hücre besiyeri karışımı ekildi.
- Petri kapları 37 ^{o}C ve CO_2'li inkübatöre kaldırıldı.

2.2.6. *Viscum album* L. Dozlarının Ayarlanması

4 g *Viscum album* L. ekstraktı 25mL hücre kültürüne uygun etil alkolde çözüldü. %1 etil alkol oranını geçmeyecek şekilde 1600µg/ml, 1400µg/ml, 1200µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonunda dozlar hazırlandı.

2.2.7. A549 Hücrelerine *Viscum album* L. Ekstraktı Dozlarının Uygulanması

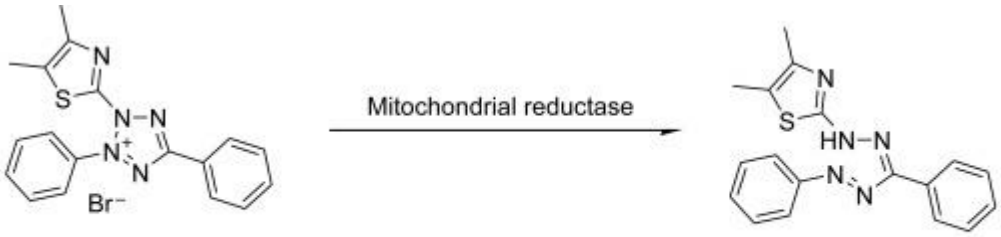
- Hücreler inkübatörden çıkarılıp mikroskopta incelendi.
- Hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1,5 µl PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- 1,5 µl Tripsin eklendi ve 37 ^{o}C'de 5 dk inkübe edildi.
- Hücreler falkona aktarılarak 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.

- Supernatant kısmı atılıp altta kalan hücre pelletine 3mL besiyeri eklenip pipetaj yapıldı.
- 20 µl hücreye 20 µl Trypan Blue eklenip pipetaj yapıldı.
- Thoma lamında sayım yapıldı.
- Herbir kuyucukta $5x10^3$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere ekilip 24 saat inkübe edildi.
- Herbir dozdan 6 tekrarlı olacak şekilde hücrelere verildi.
- 24 saatin sonunda hücreler inkübasyondan çıkarılıp besiyerleri atıldı.
- Hücrelerin bulunduğu herbir kuyucuğa hazırlanan dozlardan 100 µl eklendi.
- Kontrol kuyucuklarında bulunan hücrelerin üzerine 100 µl besiyeri eklendi.
- Blank kuyucuklarında hücre bulunmaz sadece besiyeri koyuldu.
- Plateler 48, 72 ve 96 saat ayrı ayrı inkübe edildi.
- *Viscum album* L. dozları uygulanmış her bir kuyucuğa 24 saatte bir olacak şekilde, her bir kuyucuğun içerisinde bulunan doz-besiyeri karışımının 50 µl çekilip atıldı. 50 µl taze doz-besiyeri karışımı eklendi.
- Aynı işlemler HEK-293 hücrelerine de uygulandı.

2.2.8. MTT Yöntemi İle IC_{50} Değerinin Tespiti

MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromür) testinin esas amacı, ayrıntılı hücre sayımına gerek olmadan daha yüksek verimde canlı hücreleri ölçmeye dayanır. MTT testi en yaygın olarak kolorimetrik deneylerde, farklı konsantrasyonlardaki ilaçların sitotoksisitelerini belirlemede, hücre canlılığı ve proliferasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. MTT solüsyonu sarımsı sulu bir çözeltidir. Bu, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan indirgeyici ajanlarla indirgendiğinde, suda çözünmeyen mor-mavi formazan oluşturur. MTT testinin çalışma prensibi, canlı hücrelerde mitokondriyal aktivitenin sabit olması sebebiyle, canlı hücre sayısındaki artış ve azalış mitokondriyal aktivite ile bağlantılı olmasına dayanır. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, MTT'nin tetrazolium tuzunun homojen ölçüm için çözülebilen formazan kristallerine dönüştürülmesi ile ölçülebilir (Şekil 2.1). Hücre canlılığındaki artış veya azalış, 540 nm'de, spektrofotometrik ölçümle, optik dansiteye yansıyan formazan konsantrasyonunun ölçülmesiyle gözlemlenebilir.

İlaç etkinliği çalışmalarında, farklı dozlardaki ilaçların uygulandığı hücre kuyucukları ile kontrol kuyucukları karşılaştırılarak sonuç elde edilir (van Meerloo ve ark 2011, Stockert ve ark 2012).



3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide **(MTT)**

(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenyl-formazan **(formazan)**

Şekil 2.1. MTT'nin formazana enzimatik indirgenmesi (V. Kuete ve ark 2017).

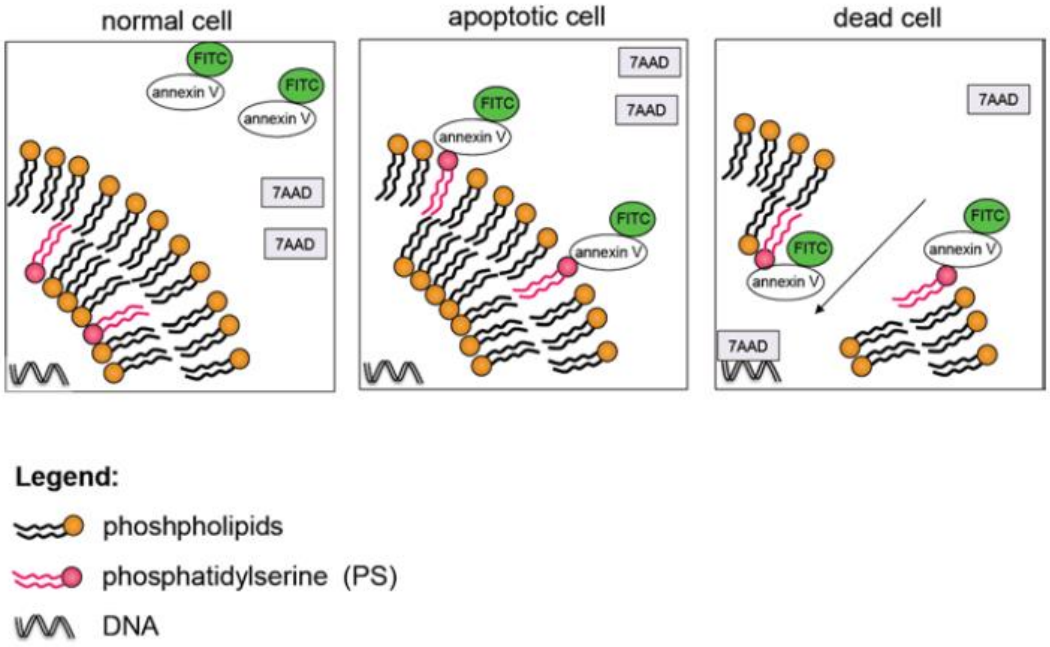
- 1000 µl MTT kiti hazırlamak için, 5 mg MTT tozu tartıldı ve üzerine 1000 µL PBS eklendi.
- 48, 72 ve 96 saat inkübe edilen hücreler 3 ayrı günde MTT testine tabi tutuldu.
- Herbir kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 20 µl eklendi.
- 3 saat 37^{o}C'de inkübe edildi.
- İnkübatörden çıkarılan plate'deki besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Herbir kuyucuğa MTT solüsyonu ile oluşan formazon kristallerini çözmesi için 150 µl DMSO eklendi.
- Alüminyum folyoya sarılarak 20 dk karıştırıcıda bekletildi.
- Spektrofotometrik yöntemle absorbans ölçümü yapıldı.

2.2.9. Annexin V Yöntemi İle Apopitoz Analizi

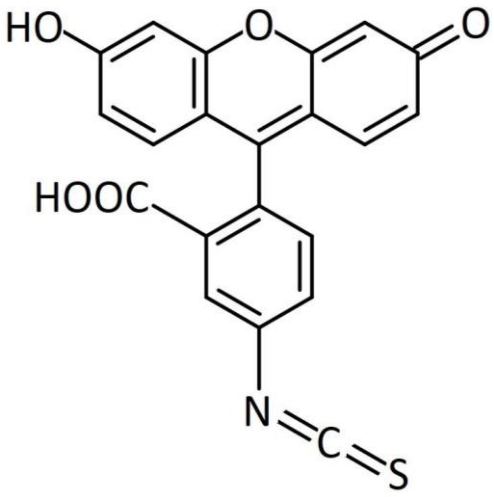
Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnneksinV, hücrenin dış yüzeyine transloke olan

fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için (Şekil 2.2), floresan bir madde (Şekil 2.3) (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V komplesinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Güleş Ö 2008).

7-Aminoaktinomisin D (7AAD), DNA'ya güçlü bir afinitesi olan bir floresan kimyasal bileşiktir. Floresan mikroskopisinde ve akış sitometrisinde DNA için bir floresan marker olarak kullanılır. Annexin V ve 7AAD sağlam bir hücre zarından geçemez.



Şekil 2.2. Annexin V ve 7-AAD boyama ile canlılık ve apoptoz tespiti



Şekil 2.3. Floresein izotiyosiyanat'ın molekül yapısı

- A549 hücreleri sıvı azot tankından çıkarılıp ekildi. 2 gün ara ile besiyerleri değiştirildi ve inkübe edildi.
- Hücreler inkübatörden çıkarılıp besiyerleri uzaklaştırıldı.
- PBS ile yıkanan hücelere Tripsin eklendi ve 37 ^{o}C'de 5 dk inkübe edildi.
- Tripsin ile kaldırılan hücreler falkona aktarıldı. Tripsinin 2 katı kadar besiyeri eklendi.
- 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım atıldı.
- Altta kalan pellet kısma besiyeri ve Trypan Blue eklendi.
- Thoma Lamında hücre sayımı yapıldı.
- 6 kuyucuklu petri kabına, her kuyucukta $5x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 3 tekrarlı çalışıldı.
- CO_2'li 37^{o}C inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
- MTT yöntemi ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda, *Viscum album L.* ekstraktı hücrelere uygulandı. Kontrol hücrelerine aynı miktarda besiyeri eklendi.
- MTT testinde olduğu gibi hücrelerin 24 saatte bir olmak üzere içerisinde bulunan doz-besiyeri karışımının %50'si çekilip atıldı. Taze doz-besiyeri karışımı aynı miktarda eklendi.

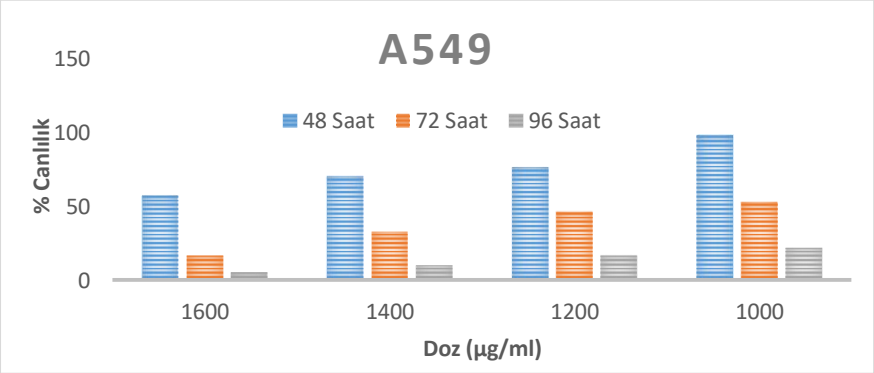
- 72. saatte hücrelerden besiyeri uaklaştırıldı.
- Hücreler PBS ile yıkanıp Tripsin ile kaldırıldı. Üzerine besiyeri eklendi.
- Eppendorfa kaldırıldı.
- 350 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Supernatant kısmı atıldı.
- 100 µL PBS ile pipetaj yapıldı. PBS uzaklaştırıldı.
- 100 µL besiyeri ile hücre çöküntüsü çözdürülürdü.
- Aynı ependorfa 100 µL Annexin V & Dead Cell Reagent eklendi.
- 20 dk oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi.
- MUSE Cell Analyzer'da Annexin V ölçümü yapıldı.
- Sonuçlar değerlendirildi.

Aynı işlemler HEK-293 hücrelerine de uygulandı ve sonuçlar değerlendirildi. A549'dan farklı olarak HEK-293 hücrelerinde apopitoz analizi 48. saatte gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. *Viscum album* L. Ekstraktı Uygulanmış A549 ve HEK-293 Hücrelerinin MTT Yöntemi İle Belirlenmiş IC_{50} Değerleri

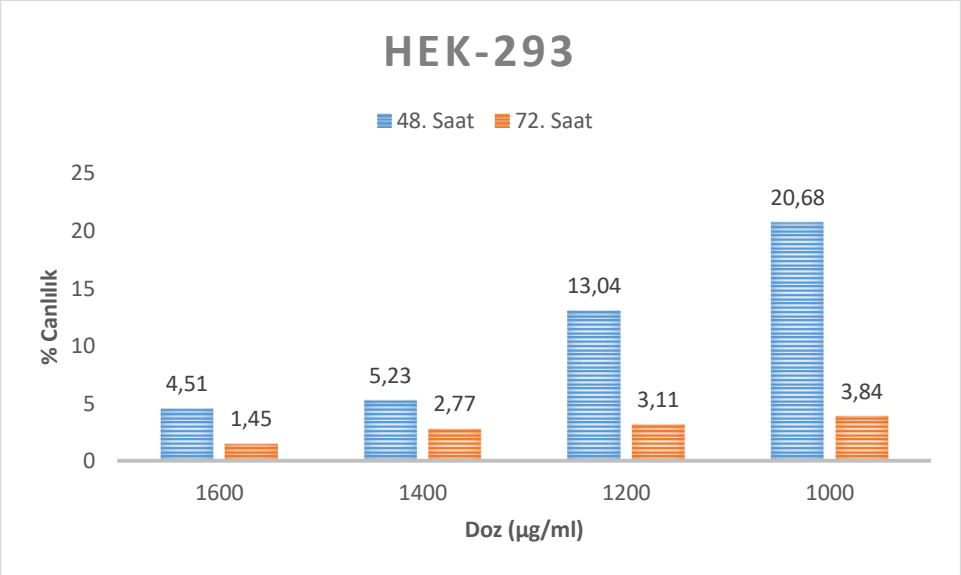
Viscum album L. doz konsantrasyonunu belirlemek için literatür taraması yaptık ve 10-400 µg/mL konsantrasyon aralığında *Viscum album* L. ekstraktı dozları hazırladık. Bu konsantrasyonlar ile 96 kuyucuklu platete her (6 tekrarlı çalışıldı) kuyucukta $7x10^3$ sayıda bulunan A549 hücrelerine yaptığımız MTT testi sonucunda hücrelerin proliferasyonunun daha da arttığını gözlemledik. *Viscum album* L. doz konsantrasyonlarının düşük olduğunu varsayarak konsantrasyon aralığını 1000-1600 µg/mL aralığına yükselttik ve kuyucuk başına hücre sayısını $5x10^3$ olarak ayarladık. Yine 6 tekrarlı çalışma yapıldı. A549 hücrelerine *Viscum album* L. ekstraktından 1000 µg/mL, 1200 µg/mL, 1400 µg/mL, 1600 µg/mL dozlarda uyguladık ve MTT yöntemi ile proliferasyon analizi sonuçlarının doza ve zamana bağlı değişimi Grafik 3.1.de verilmiştir. Aynı proliferasyon analizi aynı doz aralığında böbrek epiteli hücre hattı olan HEK-293 hücrelerine de uygulandı.



	% Canlılık		
Doz (µg/ml)	**48 Saat**	**72 Saat**	**96 Saat**
1600	57,21	16,4	5,19
1400	70,47	32,42	10,01
1200	76,43	46,09	16,46
1000	98,16	52,42	21,6

Grafik 3.1. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 48, 72 ve 96. saatteki % canlılıkları.

Viscum album L. ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisini araştırmak amacıyla A549 hücrelerine uyguladığımız *Viscum album* L. dozlarını HEK-293 hücrelerine de uyguladık. MTT yöntemi ile yapılan proliferasyon analizi sonuçları Grafik 3.2.'de gösterilmiştir.

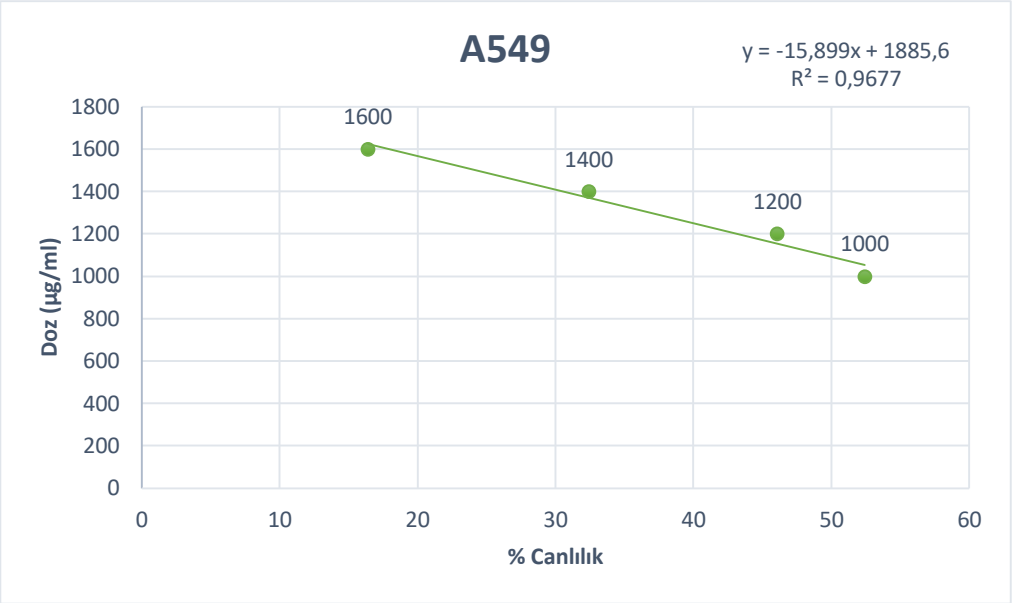


	% Canlılık	
Doz (µg/ml)	**48 Saat**	**72 Saat**
1600	4,51	1,45
1400	5,23	2,77
1200	13,04	3,11
1000	20,68	3,84

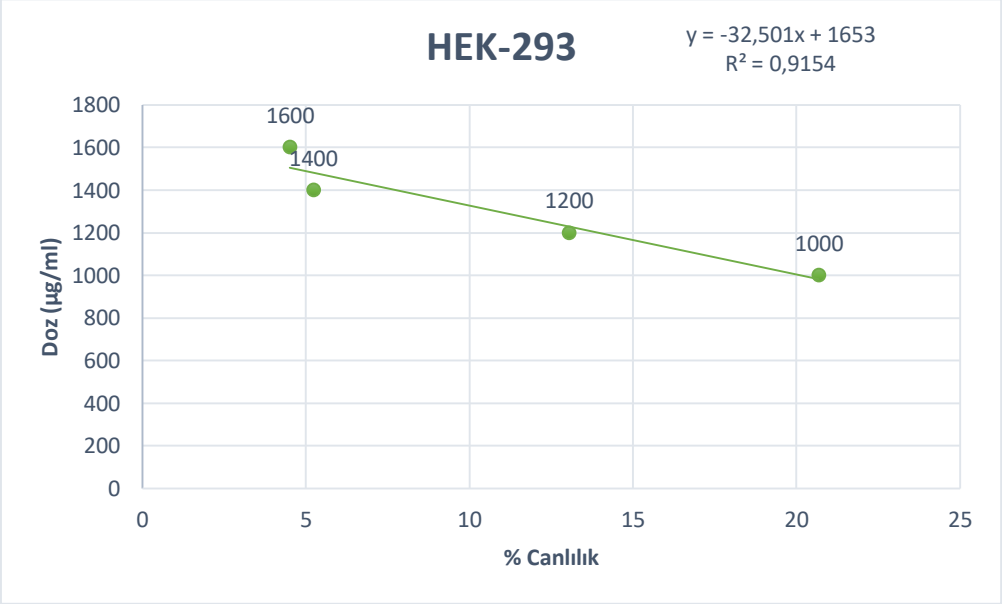
Grafik 3.2. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album L.* ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 48 ve 72. saatteki % canlılıkları.

A549 hücrelerinde IC_{50} değerine en yakın değeri 72. saatte 1000 µg/mL konsantrasyonda elde ettik ve IC_{50} değerini Grafik 3.3.'te bulunan denklemden yararlanarak hesapladık.

Sağlıklı hücre hattı olarak kullandığımız HEK-293 hücrelerinde IC_{50} değerine yakın bir değer 48. saatte de 72. saatte de elde edilememiştir. Grafik 3.4.'te bulunan denklemden yola çıkarak IC_{50} değerini hesapladık.



Grafik 3.3. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album L.* ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 72. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 1090 µg/ml).

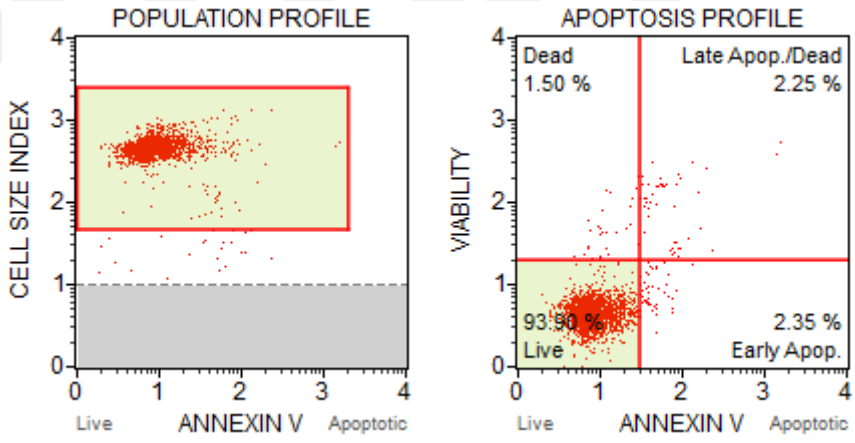


Grafik 3.4. Farklı konsantrasyonlarda *Viscum album L.* ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 48. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 413,6 µg/ml).

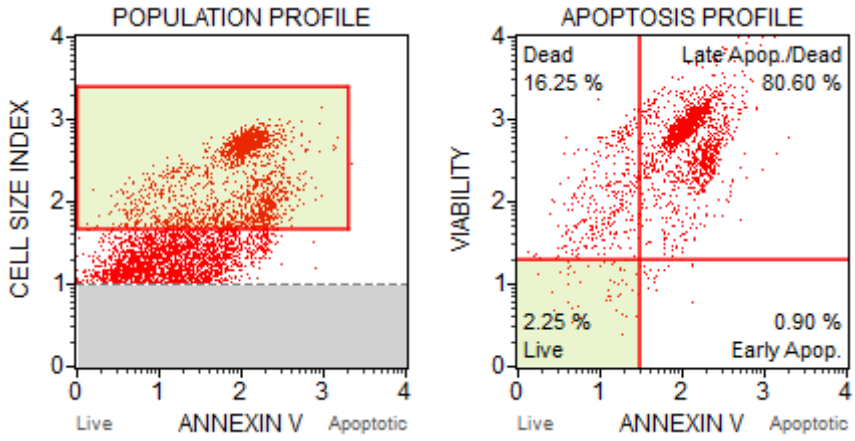
3.2. Muse/Flow Sitometri Cihazında Annexin V Yöntemi İle Apopitoz Analizi Sonuçları

A549 ve HEK-293 hücreleri 6 kuyucuklu platelere her kuyucukta $5x10^4$ olacak şekilde ekildi. Muse/Flow sitometri cihazında Annexin V yöntemi ile apopitoz analizi yapıldı. Hücrenin apopitoza uğramasıyla hücre iç yüzeyinde bulunan fosfotidil serin membranın dış yüzeyine transloke olur. Dış yüzeye transloke olan fosfotidiserine Annexin V'ın bağlanması ve 7AAD'nin hücre çekirdeğinde bulunan DNA'ya bağlanması durumuna (bölüm 2.2.9'da da anlatıldığı gibi) göre sonuçlar elde edildi. Muse/Flow sitometri cihazından elde edilen sonuçlara göre (Grafik 3.5, Grafik 3.6 ve Tablo 3.3) A549 hücrelerinin özellikle %80,60 oranında geç apopitoza gittiği görülmüştür.

Aynı şekilde HEK-293 hücrelerinin Annexin V yöntemi ile apopitoz analizi sonuçlarında Grafik 3.7,Grafik 3.8 ve Tablo 3.4'de görüldüğü gibi daha çok geç apopitoza ve düşük oranda da erken apopitoza gittiği görülmüştür.



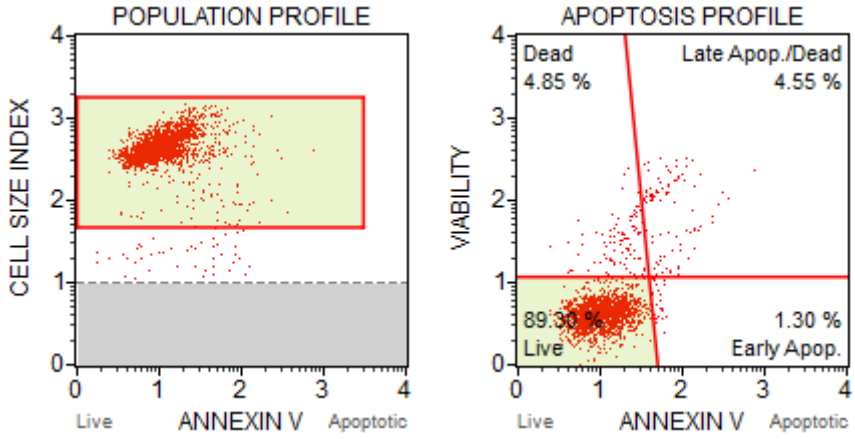
Grafik 3.5. A549 kontrol hücrelerinin apopitoz grafikleri.



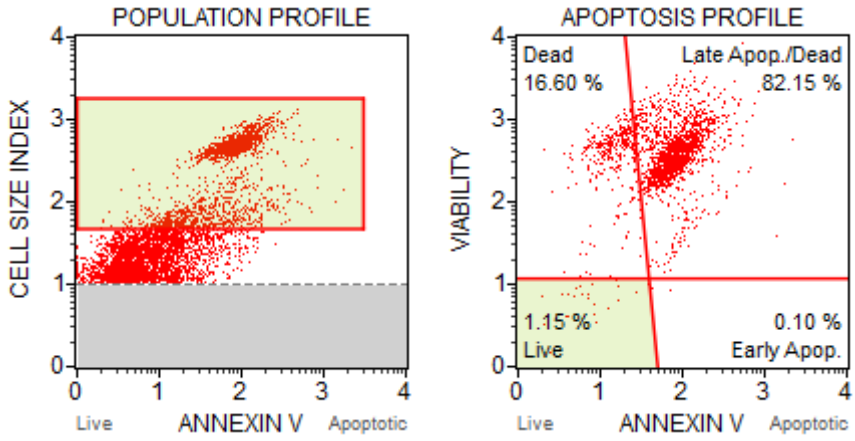
Grafik 3.6. IC_{50} dozunda *Viscum album L.* ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 72. saatteki apoptoz grafikleri.

Tablo 3.1. *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 72. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

A549	% Canlılık	Erken Apoptotik	Geç Apoptotik	Debris	Toplam Apoptotik
Kontrol	% 93.90	% 2.35	% 2.25	% 1.50	% 4.60
Viscum album L.	% 2.25	% 0.90	% 80.60	% 16.25	% 81.50



Grafik 3.7. HEK-293 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.



Grafik 3.8. IC_{50} dozunda *Viscum album L.* ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 48. saatteki apoptoz grafikleri.

Tablo 3.2. *Viscum album* L. ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 48. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

HEK-293	% Canlılık	Erken Apoptotik	Geç Apoptotik	Debris	Toplam Apoptotik
Kontrol	% 89.30	% 1.30	% 4.55	% 4.85	% 5.85
Viscum album	% 1.15	% 0.10	% 82.15	% 16.60	% 82.25

4. TARTIŞMA

Akciğer kanseri dünya çapında önemli ve yaygın hastalıklardan biridir. Akciğer kanseri, keratinosit karsinomu hariç teşhis edilen en yaygın kanser türü olup kansere bağlı ölümlerin en başında yer almaktadır. Akciğer kanseri, tüm kanser türlerinin erkeklerde %17'sini kadınlarda %9'unu ve kansere bağlı ölümlerin %19'unu oluşturur. Akciğer kanseri son 100 yılın başlarında en nadir hastalık olarak gösterilirken, özellikle erkeklerde dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en sık görülen nedeni haline gelmiştir. İleri akciğer kanseri olan hastalarda prognoz kötüdür ve sağkalım ortalama 1 yıldır.

Akciğer kanserinde hastalığın tipi ve evresine göre cerrahi müdahale ya da kemoterapik ilaçlar ile tedavi uygulanabilmektedir. Kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi gibi modern tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin olması sebebiyle geleneksel olarak pekçok hastalığın tedavisinde kullanılan tıbbi bitkilerin antikanser özelliği ile ilgili çalışmalar yapılmış ve kanser tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Viscum album L. (VA) uzun yıllardır geleneksel olarak pekçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. İçeriğinde bulunan lektinler ve viskotoksinlerin antikanser özellikleri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Duong Van Huyen ve ark. yaptığı çalışmada, çeşitli *Viscum album* (VA) preparatlarının, lenfoblastoid ve monositik hücre hatlarında sitotoksisitesini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. VA preparatları, Avrupa ökseotu sulu ekstraktlarından oluşturulmuştur. VA preparatları, doza bağlı hücre ölümüne ve lenfoblastoid T hücre hatlarında ve transforme monositik hatlarda hücre proliferasyonunun inhibisyonuna neden olmuştur. Buna karşılık, test edilen B hücre hatlarının çoğu, VA özütleri tarafından indüklenen sitotoksisiteye direnç göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan VA ekstraktlarının konsantrasyon aralığı 1-10 ng/ml seviyelerine karşılık gelmektedir. İlginç bir şekilde, düşük konsantrasyonlarda (6.25 ve 12.5 ug /mL) VA ekstraktlarıyla, proliferasyonun belirgin bir inhibisyonu olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, hücre toksisitesi deneyleri ile karşılaştırıldığında, bu sonuçlar VA ekstraktlarının sitotoksik bir etkinin yokluğunda düşük

konsantrasyonlarda sitostatik özelliklere sahip olduğunu kuvvetle göstermektedir (Duong Van Huyen ve ark 2003).

Kim ve ark. tümör hücreleri üzerindeki ökse otu lektinlerinin yıkıcı mekanizmasına, c-JUN N-terminal kinaz (JNK) / stresle aktive edilen protein kinazın aktivasyonu yoluyla aracılık etmişlerdir. Burada, kaspaz kaskadı ve bunun proteolitik bölünme etkilerini insan miyeloleukemik U937 hücrelerinin biyo-substratları üzerindeki etkisini D-galaktosid ve N-asetil galaktosamine özgü Kore ökseotu lektin-II ile araştırmışlardır. Sonuç olarak, Kore ökseotu lektin-II'nin, kaspaz 3, 8 ve 9'un zamana ve doza bağlı bir şekilde aktivasyonunu sağlayarak U937 hücrelerinin apoptotik ölümünü indüklediğine dair kanıt sağlamışlardır (Kim ve ark 2000).

Pieme ve ark. yapmış olduğu çalışmada, *Viscum album* ve Urena lobata ekstraktlarının meme kanseri hücre hatları üzerindeki in vitro antiproliferatif ve antioksidan aktivitelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Antiproliferatif aktivitenin sonuçlarında VA ekstresinin, 172 mg L^{-1}'lik IC_{50} ile hücrelerin yaşayabilirliğinin önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. VA ekstraktı MB-MDA435 hücre hattında önemli antiproliferatif ve antioksidan özellikler göstermişlerdir (Pieme ve ark 2010).

Urech ve ark. *Viscum album* L'den lipofilik bir özüt olan viscinin, antiproliferatif ve apoptoz indükleyici aktivitesini araştırmışlardır. Viscin, Molt4, K562 ve U937 lösemi hücrelerinde büyümeyi inhibe etmiş ve apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur. Viscin'in büyüme inhibitör etkisi K562 hücrelerine göre (IC_{50}: 252-37 μgmL^{-1}) Molt4 ve U937 hücrelerinde daha belirgin bulunmuştur (IC_{50}: 118-24 μgmL^{-1} ve 138-24 μgmL^{-1}). 250 μgmL^{-1} konsantrasyonda viscin, Molt4 ve U937 hücrelerinin metabolik aktivitesini neredeyse tamamen ortadan kaldırmıştır. Viscin, üç hücre hattının hepsinde doza bağımlı bir şekilde apoptozu indüklemiştir. K562'nin Molt4 veya U937'den daha az duyarlı olduğu görülmüştür (Urech ve ark 2005).

Weissenstein ve ark. yaptığı in vitro çalışmada, standart *Viscum album* preparatlarının, birçok yaygın geleneksel kemoterapötik ilacın sitostatik ve sitotoksik aktivitesi üzerindeki etkisi, farklı kanser hücre dizileri kullanılarak araştırılmıştır. İnsan meme karsinomu hücre hatları HCC1937 ve HCC1143, doksorubisin hidroklorür ile, pankreas adenokarsinom hücre hattı PA-TU-8902 gemsitabin hidroklorür ile, prostat karsinom hücre hattı DU145 doksetosantronem hidroklorür ile

tedavi edildi. Akciğer karsinom hücre hattı NCI60 dosetaksel ve sisplatin ile tedavi edildi. İlgili kemoterapötik ilacın her bir dozu, klinik olarak ilgili konsantrasyonlarda *Viscum album* ekstresi (VAE) ile birleştirilmiş, proliferasyon ve apoptoz ölçülmüştür. VAE, deney ortamlarının hiçbirinde kemoterapiye bağlı sitostaz ve sitotoksisiteyi inhibe etmemiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda VAE, ilave bir engelleyici etki göstermiştir. İn vitro sonuçlar, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara ve VAE'ye eşzamanlı olarak maruz bırakılmasından, ekstrakt-ilaç etkileşimleri ile herhangi bir güvenlik riski beklenmediğini göstermişlerdir (Weissenstein ve ark 2016).

Urech ve ark. yapmış oldukları bir diğer çalışma ile insan mesane karsinomu hücre hatlarında, *Viscum album* ekstresinin (VA-E) antiproliferatif potansiyelini, yüzeysel mesane kanserinin intravezikal tedavisi için olası kullanımı açısından değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Proliferasyon (MTT testi veya 3H timidin katılımı), nekrotik parçalanma (önceden etiketlenmiş hücrelerin 3H-timidin salınımı) ve apoptotik ve / veya nekrotik hücrelerin kısımları (Annexin-V bağlanması, propidyum iyodür (PI) etiketleme ve Akış sitometrisi ile DNA-floresan profilleri), in vitro kültürlenen dört farklı insan mesane karsinomu hücre hattında (T24, TCCSUP, J82 ve UM-UC3) ölçülmüştür. Sonuç olarak, VA-E ve sitotoksik proteinler, yani ökse otu lektinleri (ML) ve viskotoksinler (VT), mesane karsinom hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir (Urech ve ark 2006).

Harmsma ve ark. yaptığı çalışmada, *Viscum album* ekstraktı (Iscador Qu ve M preparatlarının, meşe ve elma ağacında yetişen Avrupa ökseotu suyundan fermente edilmiş ekstraktların), hücre döngüsü inhibisyonu ve/veya kanser hücrelerinde apoptotik sinyal yollarına müdahale ile tümör gerilemesini indüklediği hipotezini test etmeyi amaçlamışlardır. Ayrıca spesifik apaptotik proteinler için hücreleri boyayarak hangi apoptotik sinyal yollarının aktive edildiğini incelemişlerdir. Sonuç olarak, Iscador'un hücre döngüsü ilerlemesinde özellikle S fazını geciktirerek ve apoptotik hücre ölümüne neden olarak tümör ve endotelyal hücre büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Iscador Qu ve M'ye duyarlılık, farklı tümör hücre dizileri arasında güçlü bir şekilde değişmiştir. Iscador Qu ile tedavi edilen HaCaT hücrelerinde proapoptotik proteinler için immüno-lekeleme sadece mitokondriyal yolun tutulmasını ortaya çıkarırken, Iscador M ile tedavi edilen hücrelerde ölüm

reseptör yolu ve mitokondriyal yol tutulmuş gibi görünmektedir (Harmsma ve ark 2006).

Delebinski ve ark. *Viscum album* L'den gelen triterpen asit içeren ekstrelerin akut lenfoblastik lösemide, apoptozu indükleyip indüklemediğini araştırmışlardır. Çözündürülmüş triterpen asit veya lektin içeren *Viscum album* L. özleri, hücre proliferasyonunu inhibe etmiş ve in vitro sitotoksik özellikler göstermiştir. Annexin V/PI ve mitokondriyal membran potansiyel analizleri, apoptozun doza bağlı indüksiyonunun ana mekanizma olduğunu göstermiştir. Lektin- (viscum) ve triterpenen ihtiva eden (TT) ekstraktların kombinasyonu (viscumTT), en büyük apoptoz indüksiyonuna neden olmuştur. Ayrıca kaspaz aktivitesi, bu ekstraktların hem kaspaz-8 hem de -9 bağımlı yollardan apoptozu indükleyebildiğini göstermiştir (Delebinski ve ark 2012).

Felenda ve ark. yaptıkları in vitro bir çalışmada, farklı konakçı ağaçlardan gelen *Viscum album* preparatlarının antiproliferatif potansiyelini araştırmayı ve ökseotu lektin 1 (ML-1) ve viskotoksin A'nın (VTA) yapısal olarak benzer bir lektin ve tiyonine kıyasla etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Sonuç olarak, tam ökseotu özütünün, tümör hücresi proliferasyonunu inhibe etmek için eşdeğer bir konsantrasyon seviyesinde izole edilmiş ML-1'den daha etkili olduğunu ve tam ekstraktta bulunan fenolik bileşiklerin, antioksidatif etki ile ML-1'in sitotoksik aktivitesinin korunmasına katkı sağlayabileceğini bildirmişlerdir (Felenda ve ark 2019).

Vlad ve ark. yaptığı mevcut çalışmada, *Viscum album*'un biyolojik aktivitesini doğrulayan en ilgili bileşenleri tanımlamak için genç yaprak ve dallarının sulu ve alkollü ekstraktlarını değerlendirmiştir. Her iki ekstrakt da önemli terpenoidlerin, yağ asitlerinin ve E vitamini gibi doğal antioksidanların varlığını ortaya koymuştur. Elde edilen ekstraktların proliferasyona karşı potansiyeli ayrıca neoplastik hücre hatları, HepG2 ve MCF-7 üzerinde araştırılmıştır. Alkollü ekstrakt daha etkili ve 75 mg/ml'lik bir konsantrasyonda önemli bir sitotoksik etki göstermiştir, ancak sulu ekstrakt kullanıldığında hücre proliferasyonunun inhibisyonu da gözlenmiştir (Vlad ve ark 2016).

Yaptığımız bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Viscum album* L.'nin etanol ekstraktının A549 hücre hattında apopitoz ve proliferasyon üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. *Viscum album* L. ekstraktından farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış dozlar, A549 hücrelerine ve HEK-293 hücrelerine farklı saatlerde uygulanmıştır. *Viscum album* L. ekstraktı A549 hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmiştir. 72. saatte IC_{50} değeri 1090 µg/ml olarak bulunmuştur. HEK hücrelerinde ise 48. Saate IC_{50} değeri 413,6 µg/ml olarak bulunmuştur. Bulunan IC_{50} dozlarında *Viscum album* L. ekstraktı, $5x10^4$ hücreye uygulanmış ve apopitoz analizi Annexin V testi ile Muse cihazında yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *Viscum album* L. ekstraktı A549 hücrelerinde apopitoza neden olmuştur. Apopitozda kontrol hücrelerine göre A549 hücrelerinde yaklaşık %76 oranında apopitoz artışı gözlemlenmiştir. HEK-293 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre yaklaşık %77 oranında apopitoz artışı gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar ışığında *Viscum album* L. ekstraktı A549 hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmiş ve apopitoz oranını arttırmıştır. Fakat kanser hücresine antiproliferatif ve apoptozu indükleyici etki gösterirken, normal hücrelere etkisini gözlemlemek amacıyla kullandığımız HEK-293 hücrelerinde proliferasyonu daha çok inhibe etmiş ve HEK-293 hücrelerini de apoptoza götürmüştür. Yapılan diğer çalışmalara göre VA ekstraktının A549 hücrelerini kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9'u aktive ederek apoptoza götürdüğü sonucuna varılabilir. Bu sonuçlar ile *Viscum album* L. ekstraktının sağlıklı ve kanser hücrelerinde hangi yolakları etkilediği ayrıntılı tespit edilmeli ve buna yönelik çalışmaların geliştirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Yapılan diğer çalışmalar literatürde taranmış, VA ekstraktının diğer kanser hücrelerine gösterdiği etkilerin benzer olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda, VA ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisi araştırılmamış sadece kanser hücrelerine etkisi araştırılmıştır. Yaptığımız bu tez çalışmasında hem akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde hem de sağlıklı böbrek epiteli hücre hattı olan HEK-293 hücrelerinde proliferasyon ve apopitoz çalışmaları yapılmıştır.

Schad ve ark. yapmış oldukları in vivo bir çalışmada evre IV KHDAK hastalarında *Viscum album*'un kemoterapiye ek olarak sağkalım üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Hastaların ortalama yaşı 64, hastalardan %55.7'si erkek bireylerden oluşmaktadır. Hastaların çoğu şimdi yada geçmişte sigara içen bireyler ve %72'sinde adenokarsinom tespit edilmiştir. 158 hastadan 108'ine kemoterapiye ek olarak *Viscum album* verilmiştir. Sadece kemoterapi alan hastalarda

sağkalım 8 ay iken, kemoterapiye ek olarak *Viscum album* verilen hastalarda ise sağkalım 17 aya yükselmiştir (Schad ve ark 2018). Sonuç olarak, *Viscum album*'un kemoterapiye ek tedevasinde sağkalımı arttırdığı sonucuna varmışlardır. Fakat yaptığımız bu in vitro tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlara göre *Viscum album* L. ekstraktının A549 hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmesi ve hücreleri apopitoza götürmesine ek olarak *Viscum album* L.'nin sağlıklı hücrelere etkisini araştırmak amacıyla kullandığımız HEK-293 hücrelerinde de proliferasyon inhibe olmuş ve A549 hücrelerine benzer şekilde apopitoz gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz bu in vitro sonuçlara göre *Viscum album* L.'nin hem kanser hücrelere hem de sağlıklı hücrelere etki etmesi sebebiyle kanser tedavisinde kullanılamayacağı görülmüştür. Schad ve ark. yapmış oldukları çalışma in vivo olduğu ve *Viscum album* L. bitkisinin hastalara oral yolla verildiği için sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile farklılık gösterebilmektedir. Yapılacak olan ileri çalışmalarda *Viscum album* L.'nin etki mekanizmasının aydınlatılması ve sağlıklı hücrelere de etkisinin ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri dünya çapında önemli mortalite ve düşük sağkalım oranına sahip ciddi bir hastalıktır. İleri akciğer kanseri olan hastalarda prognoz kötüdür ve sağkalım ortalama 1 yıldır. Akciğer kanserinde hastalığın tipi ve evresine göre cerrahi müdahale ya da kemoterapik ilaçlar ile tedavi uygulanabilmektedir. Kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi gibi modern tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin olması sebebiyle geleneksel olarak pekçok hastalığın tedavisinde kullanılan tıbbi bitkilerin antikanser özelliği ile ilgili çalışmalar yapılmış ve kanser tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Viscum album L. konakçı bitkinin gövdesinde yaşayıp kolayca kırılan düğümlerde yoğunlaşan, semiparazit otsu bir bitkidir. *Viscum album* L. uzun yıllardan beri genellikle hipertansiyon, diyabet, artrit, viral enfeksiyonlar, enflamasyon, kanser, sarılık, astım, epilepsi, infertilite gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde adjuvan kanser tedavisinde kullanılmaktadır. *Viscum album* L. preparatları, kanser tedavisinin yan etkilerini azaltmak veya hastaların iyileşmesine yardımcı olmak için halihazır tedavilere ek olarak kullanılmaktadır.

Farmakolojik olarak *Viscum album* L.'nin en aktif ve kullanılan bileşiği, antiproliferatif, sitotoksik ve immunomodulatör etkileri olan lektinler ve viskotoksinlerdir.

Yaptığımız bu tez çalışmasında, söğüt ağacı üzerinden toplanmış *Viscum album* L. bitkisinin etanol ekstraktı elde edilmiş ve A549 hücre hattında proliferasyon ve apopitoz üzerine etkileri incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar ile, *Viscum album* L. ektraktının A549 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve apopitozda hücreleri özellikle geç apoptoza götürdüğü görülmüştür. Elde ettiğimiz bu sonuçlar ışığında *Viscum album* L. ekstraktı A549 hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmiş ve apopitoz oranını arttırmıştır. Fakat kanser hücresine antiproliferatif ve apoptozu indükleyici etki gösterirken, normal hücrelere etkisini gözlemlemek amacıyla kullandığımız HEK-293 hücrelerinde proliferasyonu daha çok inhibe etmiş ve HEK-293 hücrelerini de apoptoza götürmüştür. Yapılan diğer çalışmalarda IC_{50} değerlerinin farklı çıkmasının sebebi olarak hem farklı hücre hatlarının kullanılması hem de *Viscum album* bitkisinin toplandığı ağacın türü, toplanma mevsimi ve ekstraksiyon işlemlerinin, kimyasal

bileşen içeriğine etkisinden dolayı olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar ile *Viscum album* L. ekstraktının sağlıklı ve kanser hücrelerinde hangi yolakları etkilediği ayrıntılı tespit edilmeli ve buna yönelik çalışmaların geliştirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Yapılan diğer çalışmalar literatürde taranmış, VA ekstraktının diğer kanser hücrelerine gösterdiği etkilerin benzer olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda, VA ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisi araştırılmamıştır. Yaptığımız bu tez çalışmasında hem akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde hem de böbrek epiteli hücre hattı olan HEK-293 hücrelerinde proliferasyon ve apopitoz çalışmaları yapılmıştır. Bu da çalışmamızın özgünlüğünü arttırmakta ve literatüre önemli katkılar sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

Akkoçlu A, Öztürk C, 1999. Akciğer Kanseri, Multidisipliner Yaklaşım. Toraks Kitapları No:IBilimsel Tıp

Yayınevi Ankara, 238s.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW, 2011. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer, 11, 2, 85-95.

Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME, 2016. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. J Thorac Oncol, 11, 10, 1653-71.

Choudhary MI, Maher S, Begum A, Abbaskhan A, Ali S, Khan A, Shafique ur R, Atta ur R, 2010. Characterization and antiglycation activity of phenolic constituents from *Viscum album* (European Mistletoe). Chem Pharm Bull (Tokyo), 58, 7, 980-2.

Cooper J, 2012. Cell line profile A549. Public Health England, ECACC catalogue no. 86012804.

Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, Narula N, Snuderl M, Fenyo D, Moreira AL, Razavian N, Tsirigos A, 2018. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. Nat Med, 24, 10, 1559-67.

Croce MV, Colussi AG, Price MR, Segal-Eiras A, 1999. Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549). Pathol Oncol Res, 5, 3, 197-204.

Dai JK, Cao D, Li CH, Gao J, Li MQ, Fan N, Wei YH, Sun ZL, Hou MY, 2019. Three new bioactive flavonoid glycosides from *Viscum album*. Chin J Nat Med, 17, 7, 545-50.

de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF, 2018. The epidemiology of lung cancer. Transl Lung Cancer Res, 7, 3, 220-33.

Delebinski CI, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ, 2012. A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. Cell Prolif, 45, 2, 176-87.

Delebinski CI, Twardziok M, Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolff J, Jager S, Eggert A, Seifert G, 2015. A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML In Vivo. PLoS One, 10, 8, e0133892.

Deliorman D, Calis I, Ergun F, Dogan BS, Buharalioglu CK, Kanzik I, 2000. Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album* ssp. album. J Ethnopharmacol, 72, 1-2, 323-9.

Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, Lobaszewski J, 2016. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. Ann Transl Med, 4, 8, 150.

Duong Van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, Kaveri SV, 2003. Comparative study of the sensitivity of lymphoblastoid and transformed monocytic cell lines to the cytotoxic effects of *Viscum album* extracts of different origin. Chemotherapy, 49, 6, 298-302.

Felenda JE, Turek C, Stintzing FC, 2019. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and purothionin on human cancer cells. J Ethnopharmacol, 236, 100-7.

Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL, 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. Exp Cell Res, 243, 2, 359-66.

Gołąbek E, 1, JS, 1, 2017. The Infestatıon Degree Of Trees Wıth Common Mıstletoe *Viscum album* L. And Theır Health Status (On The Example Of Praszka Cıty). Journal of Ecological Engineering, Volume 18, Issue 6, pages 80–5.

Güleş Ö EÜ, 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, (2) 73-78, (2) 73-8.

Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144, 5, 646-74.

Harmsma M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FC, 2006. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on cell cycle and survival of tumor cells. Arzneimittelforschung, 56, 6A, 474-82.

Heide-Jørgensen HS, 2015. The Mistletoe *Viscum album*. .

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL, 1990. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet, 335, 8691, 675-9.

Inamura K, 2017. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. Front Oncol, 7, 193.

Islam KM, Jiang X, Anggondowati T, Lin G, Ganti AK, 2015. Comorbidity and Survival in Lung Cancer Patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 24, 7, 1079-85.

Kalkan A, Vural B, Kömürcü Bayrak E, 2018. The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells. Experimed, 2018; 8(3): 71-8, 2018; 8(3): 71-8.

Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, Ryu DG, Chung SY, Jung BH, Kim YK, Moon G, Park R, 2000. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. coloratum) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. Gen Pharmacol, 34, 5, 349-55.

Kim S, Kim KC, Lee C, 2017. Mistletoe (*Viscum album*) extract targets Axl to suppress cell proliferation and overcome cisplatin- and erlotinib-resistance in non-small cell lung cancer cells. Phytomedicine, 36, 183-93.

Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P, 2015. Lung cancer: Biology and treatment options. Biochim Biophys Acta, 1856, 2, 189-210.

Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, Colasacco C, Dacic S, Hirsch FR, Kerr K, Kwiatkowski DJ, Ladanyi M, Nowak JA, Sholl L, Temple-Smolkin R, Solomon B, Souter LH, Thunnissen E, Tsao MS, Ventura CB, Wynes MW, Yatabe Y, 2018. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. J Thorac Oncol, 13, 3, 323-58.

Maier G, Fiebig HH, 2002. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. Anticancer Drugs, 13, 4, 373-9.

Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, Kroemer G, 2009. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. Cell Death Differ, 16, 1, 87-93.

Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P, 2016. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J, 48, 3, 889-902.

Melo MNO, Oliveira AP, Wiecikowski AF, Carvalho RS, Castro JL, de Oliveira FAG, Pereira HMG, da Veiga VF, Capella MMA, Rocha L, Holandino C, 2018. Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. Saudi Pharm J, 26, 3, 311-22.

Ojezele MO, 1*, EOE, 1, Arojojoye aOA, 2, 2016. Effects of *Viscum album* (mistletoe) from three host plants (cocoa, kola and coffee) on semen quality of wistar albino rats. Chemistry International 2(1) (2016) 109b-113b

Onay-Ucar E, Karagoz A, Arda N, 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. album. Fitoterapia, 77, 7-8, 556-60.

Osada H, Takahashi T, 2002. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. Oncogene, 21, 48, 7421-34.

Ostermann T, Appelbaum S, Poier D, Boehm K, Raak C, Bussing A, 2020. A Systematic Review and Meta-Analysis on the Survival of Cancer Patients Treated with a Fermented *Viscum album* L. Extract (Iscador): An Update of Findings. Complement Med Res, 1-12.

Petersen I, Warth A, 2016. Lung cancer: developments, concepts, and specific aspects of the new WHO classification. J Cancer Res Clin Oncol, 142, 5, 895-904.

Pieme CA, Penlap VN, Ngogang J, Costache M, 2010. In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. Environ Toxicol Pharmacol, 29, 3, 223-8.

Piotrowski JROaA, 2002. Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.). Can. J. Plant Pathol. , 24: 21–28 21-8.

Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzel R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J, Comb MJ, 2007. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell, 131, 6, 1190-203.

Schad F, Thronicke A, Merkle A, Matthes H, Steele ML, 2017. Immune-related and adverse drug reactions to low versus high initial doses of *Viscum album* L. in cancer patients. Phytomedicine, 36, 54-8.

Schad F, Thronicke A, Steele ML, Merkle A, Matthes B, Grah C, Matthes H, 2018. Overall survival of stage IV non-small cell lung cancer patients treated with *Viscum album* L. in addition to chemotherapy, a real-world observational multicenter analysis. PLoS One, 13, 8, e0203058.

Stockert JC, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin RW, Villanueva A, 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem, 114, 8, 785-96.

Suheel Ahmad NHM, Sultan aSM, 2018. White-berry mistletoe (*Viscum album* L.): A Hemiparasitic Plant: Occurrence and ethnobotanical use in Kashmir. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(1), 1831-3.

Taraphdar A, Roy M, Bhattacharya R, 2001. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. Current Science Association Vol. 80, No. 11, pp. 1387-96

Tomatır AeG, 2003. Apoptosıs: Programmed Cell Death. T Klin J Med Sci, 23:499-508 499-508.

Trifunschi S, 1, MFM, 1, VA, 1, SPA, 1, Gligor aR, 2, , 2015. Determination of Flavonoid and Polyphenol Compounds in *Viscum album* and Allium Sativum Extracts International Current Pharmaceutical Journal, 4(5): 382-385, 382-5.

Urech K, Buessing A, Thalmann G, Schaefermeyer H, Heusser P, 2006. Antiproliferative effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extract in urinary bladder carcinoma cell lines. Anticancer Res, 26, 4B, 3049-55.

Urech K, Scher JM, Hostanska K, Becker H, 2005. Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L. J Pharm Pharmacol, 57, 1, 101-9.

Üstüner T, Düzenli S, Kitiş YE, 2015. Determination of Infection Rate of Mistletoe (*Viscum album*) on Hosts in Niğde Province. Turkish Journal of Weed Science, 18(1): 6-14, 6-14.

V. Kuete, O. Karaosmanoglu, Sivas H, 2017. Anticancer Activities of African

Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa, CHAPTER 10.

van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J, 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol, 731, 237-45.

Vıcaş SI, 1, DR, 2, LL, 2, , Pintea A, 2, CS, 2, 2011. HPLC Fingerprint of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of *Viscum album* from Different Host Trees. Not Bot Hort Agrobot Cluj, 39(1):48-57, 48-57.

Vlad D, Cımporescu A, Popescu R, Dumıtrascu V, Dehelean C, Vlad C, Vágvölgyı C, Krısch J, Horhat F, 2016. Phytocomponents Identıfıcatıon In Mıstletoe (*Viscum album*) Young Leaves And Branches, By Gc-Ms And Antıprolıferatıve Effect On Hepg2 And Mcf7 Cell Lınes. FARMACIA, 2016, Vol. 64, 1 2016, Vol. 64, 1

Weissenstein U, Kunz M, Urech K, Regueiro U, Baumgartner S, 2016. Interaction of a standardized mistletoe (*Viscum album*) preparation with antitumor effects of Trastuzumab in vitro. BMC Complement Altern Med, 16, 271.

Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB, 2003. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. Arch Pharm Res, 26, 10, 861-7.

Yöntem MÜ, M, 2011. Biyokimya, Aybil Publishing House, p.

Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD, 2002. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. Oncogene, 21, 45, 6915-35.

Zheng M, 2016. Classification and Pathology of Lung Cancer. Surg Oncol Clin N Am, 25, 3, 447-68.

7. EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2019/12 **Toplantı Tarihi : 16.10.2019**

Karar Sayısı 2019/266 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Hüsamettin VATANSEV'in "Viscum album L. Ekstraktının İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Proliferasyon ve Apopitoz Üzerine Etkisi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 09.09.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Doç.Dr.Hüsamettin VATANSEV'in "Viscum album L. Ekstraktının İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Proliferasyon ve Apopitoz Üzerine Etkisi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.
Yardımcı Araştırmacı: Fadime OVALI.

ASLI GİBİDİR
16/10/2019
S.Selcen ÇELİK
Sekreterya

8. ÖZGEÇMİŞ



1. Adı Soyadı : Fadime OVALI

2. Doğum Tarihi : 14/05/1995

3. Öğrenim Durumu : Yüksek Lisans

4. İletişim : 0544 472 8990/ ovali.fadime@gmail.com

Derece	Üniversite	Alanı	Yılı	Ortalama
Lisans	Necmettin Erbakan Üniversitesi	Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü	2013-2017	3.10/4
Yüksek Lisans	Selçuk Üniversitesi	Tıbbi Biyokimya ABD	2017-Halen	88.85/100

4. Lisans Tezi: Kan Kanseri ve Organizma Üzerine Etkileri

5. Devam Eden Yüksek Lisans Tezi: *Viscum album* L. Ekstraktının İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Proliferasyon ve Apopitoz Üzerine Etkisi

6. Yayınlar: Akarsu T, Vatansev H, Korucu EN, Ovalı F, Gökçe R, REFERENCE RANGES OF TRACE ELEMENTS (SELENIUM, ZINC, COPPER) IN TOKAT PROVİNCE. 2019; International Journal of Biochemistry & Physiology (IJBP) ISSN: 2577-4360, Volume 4 Issue 4, DOI: 10.23 880/ijbp-16000170

7: Sınav Bilgileri: ALES: **73,50**

YökDİL: **73,75**

8. Sertifikalar:

1.Konya Biyoteknoloji Günleri Katılım Belgesi, 16 Mayıs 2017

"Zaman Yönetimi" Başarı Sertifikası, 12 Mayıs 2015, Sertifika Onay No: KS-44032-Kariyer Sokağı

"Kariyer Planlama" Başarı Sertifikası, 12 Mayıs 2015, Sertifika Onay No: KS-44031-Kariyer Sokağı

"Beden Dili" Başarı Sertifikası, 12 Mayıs 2015, Sertifika Onay No: KS-44030-Kariyer Sokağı

"Öfke ve Stres Kontrolü" Başarı Sertifikası, 12 Mayıs 2015, Sertifika Onay No: KS-44029-Kariyer Sokağı

"Gençlik İçin Liderlik" Katılım Belgesi, Gülen Yüzler Derneği